

Aus dem Nephrologischen Zentrum
der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Einfluss der Körperkerntemperatur auf den Ischämie-Reperfusionsschaden der Niere



Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hannah Schäfer

aus Hagen

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Thomas Koeppel

Prof. Dr. Holger Schmid

Mitbetreuung durch den Mitarbeiter: Julian Marschner

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 21.01.2016

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2014 bis Dezember 2014 in der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV des Klinikums der Universität München durchgeführt.

Betreut wurde die Arbeit durch Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders.

Aus dieser Arbeit hervorgegangene Veröffentlichungen

Poster-Präsentationen:

H. Schäfer, J. Marschner, H.-J. Anders, *Präoperative Wärmezufuhr bei experimenteller Ischämie-Reperfusion verbessert die Temperaturkontrolle*; Kongress für Nephrologie, 6. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Berlin 2014

Julian A. Marschner, Hannah Schäfer, Hans-Joachim Anders, *Preoperative heat supply improves temperature control in experimental ischemia reperfusion injury*, 52nd ERA-EDTA Congress, London 2015

Originalarbeit:

Julian Marschner, Hannah Schäfer, Alexander Holderied, Hans-Joachim Anders, *Optimizing mouse surgery with online rectal temperature monitoring and preoperative heat supply. Effects on post-ischemic acute kidney injury and subsequent kidney regeneration versus atrophy*. In Vorbereitung.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	VIII
1. EINLEITUNG	2
1.1. AUFBAU UND FUNKTION DER NIERE	2
1.2. DIE AKUTE NIERENSCHÄDIGUNG	3
1.2.1. DEFINITION	3
1.2.2. EPIDEMIOLOGIE DER AKUTEN NIERENSCHÄDIGUNG	5
1.2.3. ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE DER AKUTEN NIERENSCHÄDIGUNG	8
1.3. TIERMODELLE DER AKUTEN TUBULUSNEKROSE	15
1.3.1. ISCHÄMISCHE SCHÄDIGUNG	15
1.3.2. TOXISCHE SCHÄDIGUNG	18
1.3.3. SEPSIS	19
1.4. EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DIE ISCHÄMISCHE SCHÄDIGUNG	20
1.5. ZIELSETZUNG UND HYPOTHESE	23
2. MATERIAL UND METHODEN	24
2.1. MATERIAL	24
2.1.1. GERÄTE	24
2.1.2. CHEMIKALIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN	25
2.1.3. SOFTWARE	27
2.1.4. OLIGONUKLEOTID-PRIMER FÜR DIE REAL-TIME PCR	27
2.1.5. ANTIKÖRPER	28
2.2. TIEREXPERIMENTELLE METHODEN	29
2.2.1. TIERZUCHT UND TIERHALTUNG	29
2.2.2. INDUKTION EINER TRANSIENTEN ISCHÄMIE UND REPERFUSION	29
2.2.3. ORGANENTNAHME	30
2.2.4. WÄRMEVERSORGUNG	31
2.3. TRANSKRIPTIONSANALYSE	34
2.3.1. RNA ISOLATION	34
2.3.2. RNA QUANTIFIZIERUNG MITTELS SPEKTROMETRIE	34
2.3.3. UMSCHREIBUNG DER MRNA ZU CDNA	35
2.3.4. REAL-TIME PCR	36

2.4. HISTOPATHOLOGISCHE METHODEN	38
2.4.1. FÄRBUNGEN	38
2.4.2. HISTOPATHOLOGISCHE EVALUATION DER TUBULUSSCHÄDIGUNG	40
2.4.3. KOLORIMETRISCHE ANALYSEN DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN	40
2.5. STATISTISCHE ANALYSEN	41
3. ERGEBNISSE	42
3.1. TEMPERATURKONTROLLE	42
3.1.1. FEHLENDE TEMPERATURKONSTANZ BEIM BISHERIGEN VERSUCHSAUFBAU	42
3.1.2. MATERIALUNTERSUCHUNGEN	43
3.1.3. VERBESSERTE TEMPERATURSTABILITÄT IN NARKOSE	46
3.1.4. STABILE INTRAOPERATIVE TEMPERATURKURVEN	53
3.2. EINFLUSS DER TEMPERATUR DER MAUS AUF DAS AUSMAß DER SCHÄDIGUNG	58
3.2.1. ERHÖHTE TUBULÄRE SCHÄDIGUNG BEI VERBESSERTER TEMPERATURSTABILITÄT	58
3.2.2. ERHÖHTE NEUTROPHILEN-REKRUTIERUNG BEI VERBESSERTE TEMPERATURSTABILITÄT	63
3.2.3. KEIN ERHÖHTER VERLUST DER PROXIMALEN TUBULI BEI VERBESSERTE TEMPERATURSTABILITÄT	65
3.3. EINFLUSS DER DAUER DER ISCHÄMIE AUF DAS AUSMAß DER SCHÄDIGUNG	66
3.3.1. DAS AUSMAß DER TUBULÄREN SCHÄDIGUNG IST ABHÄNGIG VON DER DAUER DER ISCHÄMIE	67
3.3.2. DIE ABHÄNGIGKEIT DER ENTZÜNDLICHEN ANTWORT VON DER DAUER DER ISCHÄMIEZEIT	69
3.3.3. FEHLENDER EINFLUSS DER ISCHÄMIEZEIT AUF DEN VERLUST PROXIMALER TUBULI	72
4. DISKUSSION	74
4.1. TEMPERATURKONTROLLE	75
4.1.1. FEHLENDE TEMPERATURKONSTANZ BEIM BISHERIGEN VERSUCHSAUFBAU	75
4.1.2. VERBESSERTE TEMPERATURSTABILITÄT IN NARKOSE	77
4.1.3. STABILE INTRAOPERATIVE TEMPERATURKURVEN	79
4.2. EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DAS AUSMAß DER SCHÄDIGUNG	81
4.3. EINFLUSS DER DAUER DER ISCHÄMIE AUF DAS AUSMAß DER SCHÄDIGUNG	85
4.4. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE UND AUSBLICK	88
LITERATURVERZEICHNIS	90
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	102
LEBENS LAUF	104
DANKSAGUNG	105

Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage nach der Möglichkeit und Bedeutung einer konstanten Körperkerntemperatur von Mäusen während eines Modells der akuten Nierenschädigung, der ischämischen Reperfusion (IR). Ziel ist es dabei, die Methodik zu verbessern, um eine erhöhte Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erreichen, um so therapeutische Interventionen anhand eines Tiermodelles des akuten Nierenversagens prüfen zu können.

Zunächst stand die Methodik zum Erhalt der Körperkerntemperatur im Fokus der experimentellen Untersuchungen. Hier zeigte sich, dass eine Stabilisierung der Körperkerntemperatur in einem vorher festgelegten Zielbereich durch konstante Wärmezufuhr erreicht werden kann. Um dies zu erreichen, war die dauerhafte Wärmeversorgung beginnend in der präoperativen Phase entscheidend. Hierfür eignet sich eine in dieser Arbeit erstmalig verwendete Wärmekammer, die es ermöglicht, sich bewegende Tiere warm zu halten. So konnte die im bisherigen Versuchsaufbau auftretende intraoperative Hypothermie vermieden werden. Im zweiten Schritt wurde der Effekt der nun konstanten Körperkerntemperatur auf die ischämische Schädigung nach 24 Stunden Reperfusion untersucht. Im Vergleich zum bisherigen Versuchsaufbau zeigten sich eine Zunahme an nekrotischen Tubuli in der Perjodsäure Schiff (PAS)-Färbung der ischämischen Niere sowie ein Anstieg der Neutrophileninfiltration. Gleichzeitig konnte jedoch in der Lectin-Färbung kein erhöhter Verlust der proximalen Tubuli nachgewiesen werden. Bei den tubulären Schädigungsmarkern KIM-1 und NGAL fiel eine gesteigerte Expressionsrate auf, außerdem zeigten sich die proinflammatorischen Marker CXCL-2, IL-6 und TNF alpha erhöht. Es zeigte sich unter höherer Körperkerntemperatur eine Zunahme der tubulären Schädigung und der entzündlichen Reaktion ohne Nachweis eines Tubulusverlustes. Unter kontrollierter Körperkerntemperatur zeigte sich im dritten Schritt ein von der Dauer der Ischämie abhängiges Schädigungsmaß sowohl auf histologischer als auch auf transkriptionsanalytischer Ebene. Dies deutet auf eine nun gute Kontrolle der Temperatur-

Variable hin und dient somit der Verbesserung des Modelles, welches essentiell ist, um in weiteren Versuchen den therapeutischen Effekt der Hypothermie untersuchen zu können.

Die hier vorgenommene Optimierung der Temperaturkontrolle des Tiermodells zur Darstellung des akuten Nierenversagens durch ischämische Reperfusion ermöglicht eine bessere Standardisierung der Versuchsprotokolle unterschiedlicher Forschungsgruppen. Dadurch kann die Vergleichbarkeit der Ergebnisse verbessert werden und so ein Beitrag zur Erforschung neuer Therapieansätze des akuten Nierenversagens geleistet werden. Gleichzeitig eröffnet diese Arbeit die Möglichkeit, in weiteren Studien den hier gezeigten Effekt der Temperatur auf die ischämische Schädigung mit sicherer Temperaturkontrolle weiter zu untersuchen und die therapeutischen Optionen der Hypothermie beim akuten Nierenversagen zu evaluieren.

1. Einleitung

1.1. Aufbau und Funktion der Niere

Die Niere ist ein paariges Organ mit vielfältigen exkretorischen und endokrinen Funktionen. Zu den exkretorischen Funktionen zählen die Ausscheidung harnpflichtiger Stoffe und die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes. Auch in der Homöostase des Säure-Basen-Haushalts spielt die Niere eine entscheidende Rolle. Endokrine Funktionen der Niere sind die Produktion von Erythropoetin zur Erythropoese, Calcitriol zur Regulation des Kalziumstoffwechsels und Renin zur Blutdruckkontrolle.

Die Nieren sind im Retroperitoneum gelegen und von einer Kapsel sowie Fettgewebe umgeben. Die Blutversorgung erfolgt durch die Arteriae renales, der Abfluss über die Venae renales. Beide betreten bzw. verlassen zusammen mit den Ureteren an den Hili renales die Nieren. Die Funktionseinheit der Niere ist das Nephron. Jede Niere eines gesunden erwachsenen Menschen enthält zwischen 6×10^5 und 1×10^6 Nephrone [1]. Funktionell und anatomisch gliedert sich das Nephron in zwei Einheiten – das Nierenkörperchen und die Tubuli renales. Im Nierenkörperchen entsteht der Primärharn durch Filtration aus dem Blut, welcher über den Harnpol des Glomerulums in den Tubulusapparat gelangt. Hier entsteht durch Reabsorption und Sekretion der Endharn. Vor allem im proximalen Tubulus findet eine Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige Rückresorption von essentiellen Substanzen wie Natrium, Glukose und Aminosäuren statt [2]. Dies erklärt die hohe Anzahl an Mitochondrien in den proximalen Tubuluszellen und damit die Sensitivität dieser Zellen gegenüber Sauerstoffmangelzuständen. Die Konzentrierung des Harns erfolgt in der Henleschen Schleife mithilfe des Gegenstromprinzips, im distalen Tubulus unter Regulation von Aldosteron und zuletzt im Sammelrohr unter Antidiuretisches Hormon (ADH)-Stimulation. Anatomisch lässt sich die Niere grob in den außen liegenden Kortex renalis und die innen liegende Medulla renalis unterteilen. Die Medulla renalis kann weiter in einen inneren und äußeren Anteil geteilt werden, wobei der äußere Anteil erneut zwei Anteile hat, den äußeren Streifen der äußeren Medulla (OSOM) und den inneren Streifen der äußeren Medulla (ISOM). Definitionsgemäß unterscheidet sich der OSOM vom ISOM darin, dass im OSOM lediglich die dicken Anteile der Henleschen Schleife zu finden sind, im ISOM dicke und dünne.

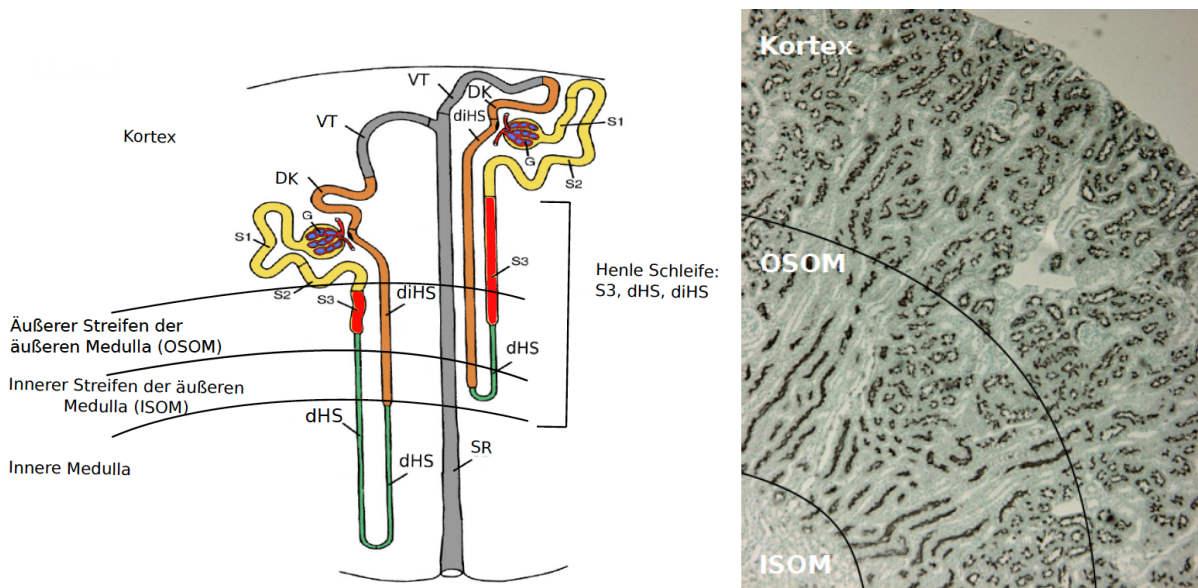


Abbildung 1: Das Nephron: A: (schematisch) Dargestellt sind ein kortikales und ein juxtamedulläres Nephron von kortikal (oben) nach papillär (unten). Der proximale Tubulus ist in Gelb, die respektiven S3-Segmente sind in Rot hervorgehoben. Die Intermediärtubuli der Henle-Schleife sind in Grün, der distale Tubulus in Orange und das Sammelrohr in Grau dargestellt. Abkürzungen: G: Glomerulum; S1, S2 und S3: Segmente 1 bis 3 des proximalen Tubulus; dHS: dünner Teil der Henle-Schleife; diHS: dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife; DK: distales Konvolut; VT: Verbindungstubulus; SR: Sammelrohr (geändert nach Raciti et al. [3]) B: Zum Vergleich dargestellt ist eine Lektinfärbung als Querschnitt durch eine gesunde Niere. Schwarz angefärbt sind die proximalen Tubuluszellen, im Kortex sind Glomeruli zu sehen. OSOM: äußerer Streifen der äußeren Medulla; ISOM: innerer Streifen der inneren Medulla.

1.2. Die akute Nierenschädigung

1.2.1. Definition

Die akute Nierenschädigung ist ein temporäres, potenziell reversibles Krankheitsbild, welches innerhalb von Stunden bis Tagen auftritt. Dabei kommt es zu einem Abfall der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und zu einem konsekutiven Anstieg harnpflichtiger Substanzen wie beispielsweise Kreatinin und Harnstoff im Serum. Häufig geht die akute Nierenschädigung zusätzlich mit einer verminderten Urinproduktion bis hin zur Anurie einher. Das Fehlen einer einheitlichen Definition hat lange Zeit die Diagnosestellung sowie die Vergleichbarkeit von Studien erschwert. 2004 stellte die „Acute Dialysis Quality Initiative“ (ADQI)-Gruppe in ihrer zweiten internationalen Consensus-Konferenz eine Definition der akuten Nierenschädigung vor und ersetzte damit die vielfachen vorher

bestehenden Definitionen und Stadieneinteilungen durch eine einheitliche [4]. Dabei wurden die sogenannten RIFLE-Kriterien festgelegt, die sowohl eine Stadieneinteilung anhand des renalen Funktionsverlustes als auch der klinischen Folgen ermöglichen. Der renale Funktionsverlust wird anhand der relativen oder absoluten Veränderung des Serumkreatinins bzw. der GFR oder anhand der Urinmenge pro Zeit quantifiziert. Es gibt drei verschiedenen Stadien der renalen Funktionsminderung: Risiko (*Risk*), Schädigung (*Injury*) und Versagen (*Failure*), und zwei Stadien, die die klinischen Folgen anhand des Langzeitverlaufes beschreiben: persistierendes akutes Nierenversagen (*Loss*) und terminales Nierenversagen (*ESKD end stage kidney disease*) [4]. Die RIFLE-Kriterien sind in Tabelle 1 dargestellt. 2007 wurden die RIFLE-Kriterien von der internationalen Organisation „*Acute Kidney Injury Network*“ (AKIN) vereinfacht und als AKIN-Kriterien vorgestellt [5]. Mit den AKIN-Kriterien können geringfügige Nierenschädigungen besser klassifiziert werden. Weiterhin wurde der Begriff des „akuten Nierenversagens“ durch „akute Nierenschädigung“ ersetzt, um dem breiten klinischen Spektrum dieser Entität gerecht zu werden und dies begrifflich zu verdeutlichen.

Tabelle 1: Stadieneinteilung der akuten Nierenschädigung nach RIFLE

RIFLE-Stadien	GFR Kriterien	Urinausscheidung	
Risiko	Anstieg des S-kreatinin x 1,5 oder GFR-Abfall > 25%	Urinausscheidung < 0.5ml/kg/h x 6h	Hohe Sensitivität
Schädigung	Anstieg des S-kreatinin x 2 oder GFR-Abfall > 50%	Urinausscheidung < 0.5ml/kg/h x 12h	
Versagen	Anstieg des S-kreatinin x 3 oder GFR-Abfall > 75% oder S-kreatinin >4mg/dl	Urinausscheidung < 0.3ml/kg/h x 24h oder Anurie x 12h	Hohe Spezifität
Persistierendes ANV	Persistierendes ANV = vollständiger Verlust der Nierenfunktion > 4 Wochen		
Terminales Nierenversagen	Terminales Nierenversagen (> 3 Monate)		

Unterteilung der RIFLE-Kriterien in 5 Stadien des akuten Nierenversagens: Risiko (*Risk*), Schaden (*Injury*), Versagen (*Failure*) persistierendes ANV (*Loss*) und terminales Nierenversagen (*ESKD*); Abkürzungen: S-Kreatinin: Serumkreatinin; GFR: glomeruläre Filtrationsrate; ANV: akutes Nierenversagen (verändert nach Bellomo und Palevsky [4])

Tabelle 2: AKIN-Kriterien der akuten Nierenschädigung**Diagnostische Kriterien des akuten Nierenversagens nach AKIN**

Eine abrupte (innerhalb von 48 Stunden) Reduzierung der Nierenfunktion derzeit definiert als ein absoluter Anstieg des Serumkreatinin um mehr als 0.3mg/dl, ein prozentualer Anstieg des Serumkreatinin um mehr als 50% (das 1.5fache des Ausgangswertes) oder eine Reduktion der Urinproduktion (dokumentierte Oligurie von 0.5ml/kg oder weniger innerhalb von sechs Stunden)

Klassifikation/Staging der akuten Nierenschädigung

Stadium	Kreatininveränderung im Serum	Urinausscheidung
1	Anstieg des Serum Kreatinin: $\geq 0.3\text{mg/dl}$ oder 1.5 bis 2 fache des Ausgangswertes	$< 0.5 \text{ ml/kg/h} \times 6\text{h}$
2	Anstieg des Serum Kreatinin: 2 bis 3 fache des Ausgangswertes	$< 0.5 \text{ ml/kg/h} \times 12\text{h}$
3	Anstieg des Serum Kreatinin: > 3 fache des Ausgangswertes oder $\geq 4.0 \text{ mg/dl}$ mit einem akuten Anstieg $> 0.5\text{mg/dl}$	$< 0.5 \text{ ml/kg/h} \times 24\text{h}$ od. Anurie $\times 12\text{h}$

Klassifikation und Stadieneinteilung modifiziert nach Mehta und AKIN [5].

Dabei umfasst die akute Nierenschädigung das gesamte Spektrum von moderatem bis hin zu schwerstem Funktionsverlust, so dass der Begriff des akuten Nierenversagens der schweren akuten Nierenschädigung vorbehalten bleibt und die Notwendigkeit der Nierenersatztherapie impliziert. Die AKIN-Kriterien sind in Tabelle 2 dargestellt. Die neueste geringfügig veränderte Definition des akuten Nierenversagens stammt von der „*Kidney Disease/Improving Global Outcomes*“ (KDIGO) AKI-Arbeitsgruppe [6]. Obwohl diese Kriterien große Akzeptanz erfahren und zur Vergleichbarkeit von Studien beigetragen haben, gibt es Kritik vor allem bezüglich der Diagnosestellung [7][8].

1.2.2. Epidemiologie der akuten Nierenschädigung

Die akute Nierenschädigung ist eine der häufigsten Erkrankungen hospitalisierter Patienten mit einer weltweiten Inzidenz von 21.6% und einer Mortalität von 23.9% [9]–[12]. Viele der epidemiologischen Studien wurden publiziert, noch bevor die oben genannten Definitionen vorgestellt wurden. Angaben zur Häufigkeit unterscheiden sich daher nicht nur nach Region und Population, ihre Vergleichbarkeit wird auch durch unterschiedliche Einschlusskriterien

erschwert. In einer aktuellen Studie konnte die akute Nierenschädigung nach den RIFLE-Kriterien bei bis zu 50% der Patienten auf der Intensivstation verzeichnet werden [13]. Bei 20% der hospitalisierten Patienten lässt sich eines der RIFLE-Stadien diagnostizieren, wobei die verschiedenen Stadien mit einem fast linearen Anstieg der Krankenhausmortalität korrelieren (Normal, 4.4%; *Risk*, 15.1%; *Injury*, 29.2%; und *Failure*, 41.1%) [14]. Dabei ist die akute Nierenschädigung ab dem *Injury*-Stadium nicht nur eine Komplikation verschiedener Grunderkrankungen, sondern per se ein eigenständiger Risikofaktor, der zu einem längeren Krankenhausaufenthalt und höherer Mortalität beiträgt [13]. Andere Daten weisen auf eine unterschiedliche Mortalität in Abhängigkeit von der Genese der Nierenschädigung hin. So lag die Mortalität zwischen 7% bei Patienten, die aufgrund einer prärenalen Nierenschädigung hospitalisiert werden [15] und 50-100% bei Patienten, die unter einer postoperativen Nierenschädigung leiden [16]. Besonders häufig von der akuten Nierenschädigung betroffen sind männliche Patienten und solche, die älter sind als 65 Jahre [17]. Ursächlich hierfür sind altersbedingte Veränderungen der Niere, vorhandene Komorbiditäten, die Einnahme von Medikamenten und bei männlichen Patienten Prostataerkrankungen. Auch Patienten mit vorbestehenden Nierenerkrankungen und Diabetes sind besonders gefährdet [18]. In den alternden Gesellschaften der Industrieländer zeigte sich ein Anstieg der Inzidenz der ambulant erworbenen akuten Nierenschädigung in den Jahren 1996 bis 2003 [19]. Auch in der PICARD-Studie, in der verschiedene Charakteristika von Patienten mit akuter Nierenschädigung auf Intensivstationen in den USA untersucht wurden, zeigte sich eine zunehmend hohe Anzahl an Komorbiditäten und extrarenalen Komplikationen. Die Krankenhausmortalität lag bei 37% [20]. Hsu et al. konnten zeigen, dass zwischen 2000 und 2009 die Inzidenz des dialysepflichtigen akuten Nierenversagens in den USA um jährlich 10% zugenommen hat, dabei steigt mit steigendem Alter die Wahrscheinlichkeit an einem dialysepflichtigen Nierenversagen zu erkranken [21] (s. Abbildung 2).

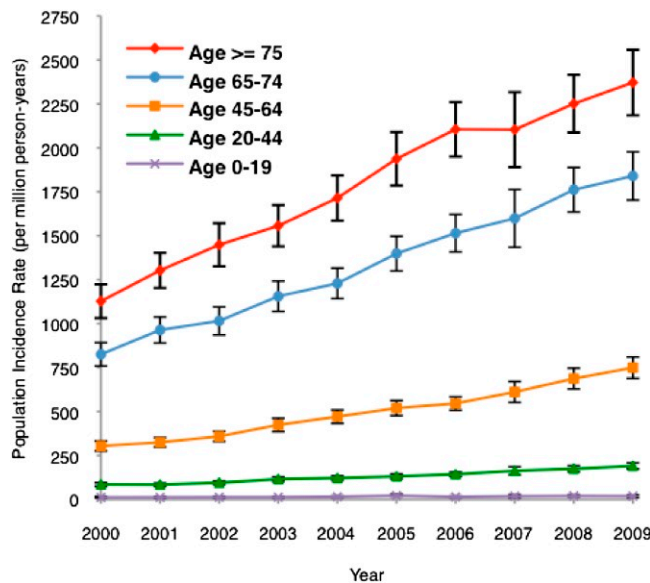


Abbildung 2: Populations-Inzidenz des dialysepflichtigen akuten Nierenversagens. Es zeigt sich ein Anstieg der Inzidenz des akuten dialysepflichtigen Nierenversagens von 2000 bis 2009 in allen Altersgruppen. Gleichzeitig zeigt sich, dass mit steigendem Lebensalter die absolute Häufigkeit des dialysepflichtigen Nierenversagens zunimmt. Abbildung aus [21].

Wird die akute Nierenschädigung überlebt und erholt sich der Patient, wurde bisher davon ausgegangen, dass Patienten mit zuvor normaler Nierenfunktion diese auch wiedererlangen [22]. Diese Aussage wurde in letzter Zeit wiederholt in Frage gestellt. So zeigte sich, dass Patienten, die unter einer akuten Nierenschädigung gelitten haben, ein deutlich höheres Risiko haben, ein terminales Nierenversagen zu erleiden [23][24]. Eine Verdoppelung der Mortalität unabhängig von anderen Grunderkrankungen konnte nachgewiesen werden [25]. Auch die Dauer und Kosten des Krankenhausaufenthaltes stiegen abhängig von dem Schweregrad der Nierenschädigung. So zeigten Chertow et. al., dass schon ein Kreatininanstieg um ≥ 0.5 mg/dl zu einem 3.5fach längeren Krankenhausaufenthalt führt. 5% Prozent aller Krankenhauskosten sind demnach auf die akute Nierenschädigung zurückzuführen [26]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die akute Nierenschädigung insbesondere in einer alternden Gesellschaft ein zunehmend häufiges Krankheitsbild sein wird, welches weiterer Forschung zur Verbesserung der Prävention, der Therapie und der Langzeitschäden bedarf.

1.2.3. Ätiologie und Pathogenese der akuten Nierenschädigung

Die klassische Einteilung der Ursachen der akuten Nierenschädigung unterscheidet zwischen prärenal, intrarenal und postrenal Ursache [27]. Die Übergänge sind dabei jedoch häufig fließend. Ungefähr 65% bis 75% der Fälle akuter Nierenschädigung bei hospitalisierten Patienten sind entweder auf prärenale Ursachen oder die akute Tubulusnekrose zurückzuführen [20][28].

Prärenale Nierenschädigung

Ursache einer prärenal Nierenschädigung ist eine verminderte Perfusion der Niere, welche zu einem renalen Funktionsverlust führt und zunächst ein rein funktioneller Schaden ohne strukturelle Veränderungen ist. Kann die auslösende Ursache erfolgreich beseitigt werden, ist eine prärenale Nierenschädigung reversibel. Besteht sie allerdings fort, kann es zum Übergang in eine intrarenale Nierenschädigung mit struktureller Schädigung im Sinne einer akuten Tubulusnekrose kommen. Eine generalisierte Minderperfusion des Körpers durch Abnahme des zirkulierenden Blutvolumens entsteht entweder durch Flüssigkeitsverluste, beispielsweise bei Diarrhoe, durch Blutverluste bei inneren oder äußeren Blutungen oder durch eine verminderte Aufnahme von Flüssigkeit. Eine generalisierte Minderperfusion wird ebenfalls durch ein vermindertes Herzzeitvolumen und Hypotension bei Herzinsuffizienz, Kreislaufchock unterschiedlicher Genese, operative Eingriffe oder iatrogen durch medikamentöse Therapie verursacht. Systemische Vasodilatation bei Sepsis oder Leberzirrhose führt weiterhin zu einer generalisierten Minderperfusion des Gewebes. Hormonelle Gegenregulationsmechanismen wie die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS), die Ausschüttung von ADH und ein gesteigerter Sympathikotonus führen zur Zentralisierung des Blutvolumens und einer weiter verminderten renalen Durchblutung. Ursachen einer selektiven renalen Minderperfusion sind eine einseitige Nierenarterienstenose bei funktioneller Einzelniere oder eine beidseitige Nierenarterienstenose sowie operatives Abklemmen der Arteriae renales zur Blutstillung bei urologischen oder gefäßchirurgischen Eingriffen. Die häufigsten Ursachen einer Nierenarterienstenose sind Atherosklerose und fibromuskuläre Dysplasie [29]. Die Nierendurchblutung kann auch medikamentös durch Vasokonstriktion der afferenten Arteriole z.B. durch nicht steroidale antiinflammatorische Drogen (NSAID) oder durch

Vasodilatation der efferenten Arteriole durch Angiotensin Converting Enzyme (ACE)-Hemmer gesenkt werden. Häufige Ursache einer akuten prärenalen Nierenschädigung ist eine Kombination mehrerer Faktoren besonders bei multimorbiden Patienten wie z.B. eine Dehydration durch Diarrhoe bei einem durch Diuretikatherapie und Herzinsuffizienz prädispositionierten Patienten. Therapeutisch wichtig ist bei jeder Genese der prärenalen akuten Nierenschädigung die Beseitigung der Ursache.

Postrenale Nierenschädigung

Die postrenale Nierenschädigung wird durch eine Obstruktion der ableitenden Harnwege hervorgerufen. Durch die Obstruktion kommt es zu einem Rückstau des Urins und so zu einer intraluminalen Druckerhöhung. Dies führt zu einer Erweiterung des Nierenbeckens und der Nierenkelche, einer Verschmälerung des Nierenparenchyms und einer verminderten Parenchymperfusion [30]. Im Verlauf nimmt die GFR ab und es entwickelt sich eine akute oder chronische Nierenschädigung. Die Obstruktion kann dabei verschiedene Ursachen und Lokalisationen haben. Bei Kindern sind angeborene Fehlbildungen des Urogenitaltraktes die häufigsten Ursachen. Junge Erwachsene leiden meist an Nephro- oder Urolithiasis, wohingegen bei älteren Patienten häufiger retroperitoneale Tumore, Prostatahyperplasie oder Prostatakarzinome ursächlich sind [9]. Seltener Ursachen sind neurogene oder medikamenteninduzierte Blasenentleerungsstörungen.

Intrarenale Nierenschädigung

Die intrarenale Nierenschädigung kann wie oben beschrieben die Folge einer prärenalen Nierenschädigung sein oder kann andere Ursachen haben. Die genuin intrarenalen Ursachen werden nach Lokalisation der Schädigung in vaskuläre Schädigung, Glomerulonephritis, akute Tubulusnekrose und interstitielle Nephritis unterteilt (s. Abbildung 3). Am häufigsten ist dabei die akute Tubulusnekrose, die in 45% aller hospitalisierten Fälle der akuten Nierenschädigung entsteht [28]. Selbige kann nach Genese in Ischämie-, Toxin- und Pigment-induzierte Tubulusnekrose unterteilt werden und wird unten ausführlich besprochen. Mikrovaskuläre Erkrankungen wie die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura, das hämolytisch-urämische Syndrom und Sepsis führen zu glomerulären kapillären Thrombosen und mikrovaskulärer Okklusion. Makrovaskuläre Schädigungen entstehen häufig durch

Atherosklerose, vor allem bei interventionellen Eingriffen. Im Rahmen dieser kann es auch zu Cholesterinembolien kommen, die ebenfalls eine akute Nierenschädigung auslösen können. Die interstitielle Nephritis, 1898 zuerst beschrieben [31], ist als weitere Ursache der akuten intrarenalen Nierenschädigung zu nennen. Sie ist durch die Präsenz inflammatorischer Zellen im Interstitium charakterisiert. Die Entzündung ist dabei nicht purulent, sondern meist steril und kann diffus oder fokal sein. Die interstitielle Nephritis ist häufig medikamenten-assoziiert, kann aber auch durch Autoimmun- und Systemerkrankungen oder infektiöse Erkrankungen verursacht werden. In über 75% der Fälle sind Medikamente der Auslöser, vor allem Antibiotika und NSAIDs [32].

Die Glomerulonephritis als akute Nierenschädigung, die sich am Glomerulum manifestiert, kann multiple Ursachen haben und sich klinisch nephritisch oder nephrotisch manifestieren. Ein weiterer Hinweis auf eine Glomerulonephritis ist ein aktives Urinsediment, welches Akanthozyten oder Erythrozytenzylinder beinhaltet.

Ist die Ursache der akuten Nierenschädigung unbekannt, wird eine Nierenbiopsie vorgenommen. Da sich wie oben beschrieben die intrarenalen Nierenschädigungen nach betroffenem Kompartiment unterscheiden, kann häufig eine definitive Diagnose mittels Histologie gestellt werden.

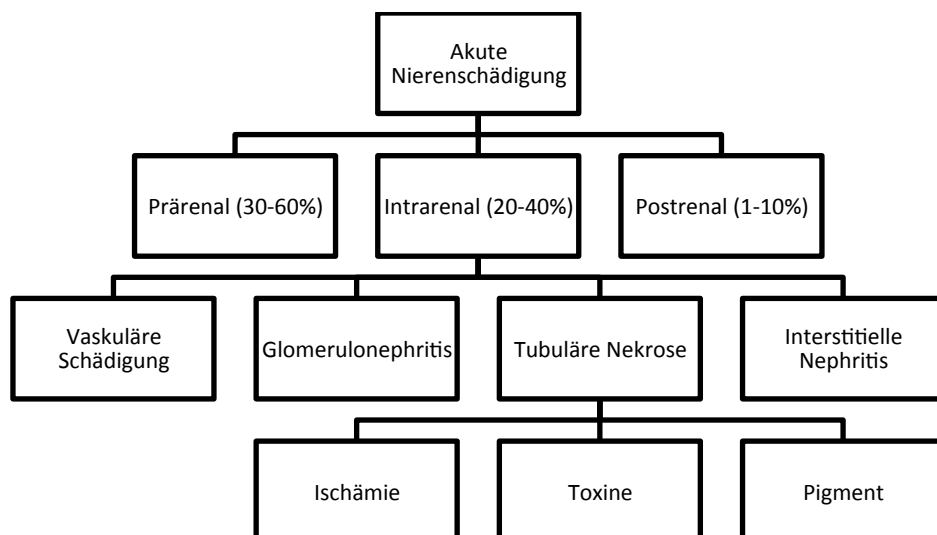


Abbildung 3: Einteilung der akuten Nierenschädigung nach Ätiologie. Prozentuale Inzidenzen in Klammern (geändert nach Nolan und Anderson [33]). Dargestellt ist die Unterscheidung der Ursachen der akuten Nierenschädigung in prärenal, intrarenal und postrenal mit weiterer Ausführung der intrarenalen Ursachen sowie der tubulären Nekrose als für diese Arbeit wichtigste Untergruppe der intrarenalen Ursachen.

Akute Tubulusnekrose

Folge der ischämischen Nierenschädigung ist die akute Tubulusnekrose, welche pathologisch durch Destruktion der Tubulusepithelzellen gekennzeichnet ist und die häufigste Ursache der akuten Nierenschädigung ist [28]. Die akute Tubulusnekrose kann unterschieden werden in eine ischämische, eine toxische und eine pigment-induzierte Form.

Ischämische akute Tubulusnekrose

Patienten, die aufgrund von Operation, Blutverlusten, Sepsis oder anderen Ursachen hypotensiv sind, sind gefährdet, eine ischämische Nierenschädigung zu erleiden, besonders dann, wenn die renale Minderperfusion lange anhält oder schwer ist. Pathophysiologisch lassen sich vier klinische und zelluläre Phasen abgrenzen: die Initiation, die Extension, die Stabilisierung und die Regeneration [34]. Die Initiationsphase, welche den Übergang der prärenalen Nierenschädigung zur tubulären Zellschädigung und Dysfunktion beinhaltet, ist gekennzeichnet durch einen Abfall der GFR. Es kommt zu einem schweren zellulären ATP-Mangel mit konsekutiver Schädigung der Tubuluszellen. Dabei sind die S3-Segmente der proximalen Tubuluszellen, die aufgrund ihrer vielfältigen aktiven Transportmechanismen einen hohen ATP-Verbrauch haben, besonders gefährdet [35]. Histologisch zeigt sich zuerst eine Blasenbildung der Tubuluszellen, die gefolgt ist von einem Verlust des Bürstensaums, wodurch die tubuläre Absorptionsfähigkeit reduziert wird. Proximale Tubuluszellen verlieren ihre Polarität und die basolateral lokalisierte Natrium-Kalium-ATPase wandert nach luminal [36]. Es kommt zu einer pathologischen Natriumsekretion ins Lumen. Tight-Junctions verlieren ihre Integrität, was durch Rückfluss von glomerulärem Filtrat ins Interstitium zu einem Ödem führt und die GFR herabsetzt [37] (s. Abbildung 4). Tubuluszellen werden abgeschilfert und nekrotische und vitale Zellen gelangen ins Lumen [38]. Die übriggebliebenen Zellen verteilen sich und schließen die Lücken, die Tubuli erscheinen dadurch dilatiert. Durch eine gestörte Zusammensetzung des Filtrats im distalen Tubulus mit einem hohen Anteil an Proteinen und Zellresten kommt es zur Bildung von Zylindern. Zusammen mit den nekrotischen Zellresten verstopfen diese die Tubuli und senken die GFR weiter. Die verminderte Resorption hat eine höhere Natriumkonzentration in der Macula densa des distalen Tubulus zur Folge. Über Aktivierung des tubuloglomerulären Feedbacks kommt es zu einer afferenten Vasokonstriktion mit dem Ziel der Reduzierung der tubulären Flussrate [39]. Dies führt zu einem Circulus vitiosus mit weiterer GFR Reduktion. Die geschädigten

Tubuluszellen sezernieren proinflammatorische Chemokine und Zytokine und setzen somit eine sterile Entzündung in Gang [40]. Die Extensionsphase wird von zwei Ereignissen bestimmt: anhaltende Ischämie nach dem initialen ischämischen Event und inflammatorische Antwort auf die Zytokinfreisetzung der ischämischen Zellen [41]. Besonders ausgeprägt ist dies in der äußeren Medulla, wo es zu einer weiteren Schädigung der S3-Segmente sowie des dicken aufsteigenden Tubulus kommt. Ursächlich sind vermutlich ein geschädigtes renales Endothel sowie die inflammatorische Antwort [42]. Im Kortex, wo die Perfusion fast normwertig ist, kommt es zur Regeneration der proximalen Tubuluszellen [41]. Während der Extensionsphase fällt die GFR weiter. In der Stabilisierungsphase, welche meist ein bis zwei Wochen dauert, erreicht die GFR ihren Tiefpunkt. Durch die dauerhaft niedrige GFR kommt es zur Akkumulation harnpflichtiger Substanzen und Patienten können urämische Symptome entwickeln. Die Regenerationsphase ist durch einen Anstieg der Urinausscheidung und einen Abfall des Serumkreatinins gekennzeichnet. Häufig geht sie mit einer polyurischen Phase einher, die auf der noch nicht wiederhergestellten Fähigkeit der Tubuluszellen zur Harnkonzentrierung beruht.

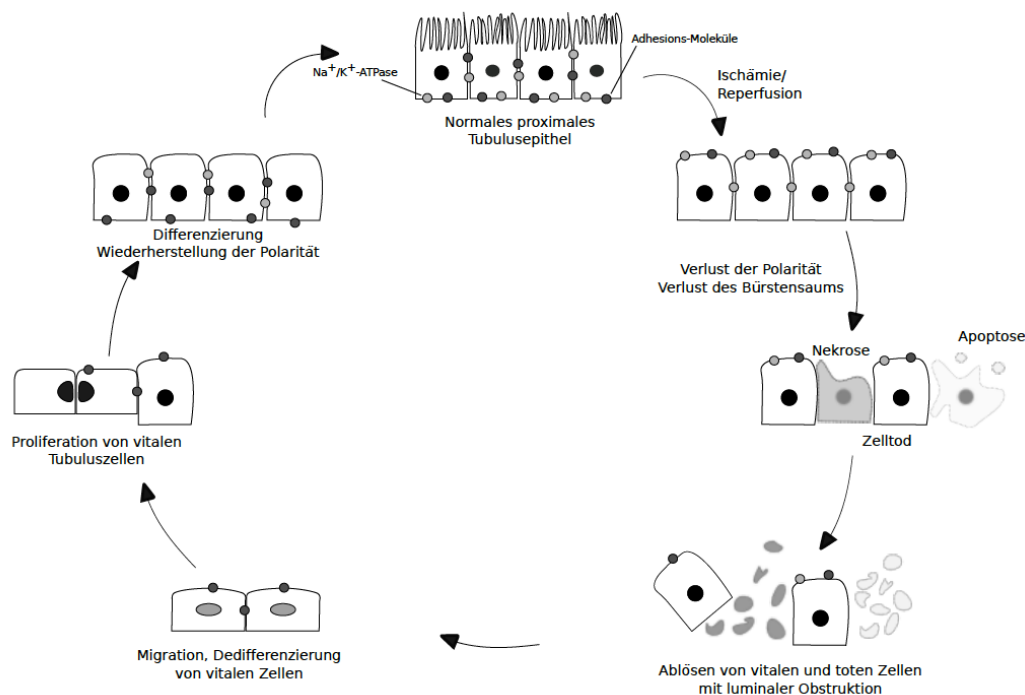


Abbildung 4: Proximale Tubuluszellen im Verlauf der ischämischen Schädigung. Im Verlauf der ischämischen Schädigung kommt es zu einem Verlust der Polarität sowie des Bürstensaums. Es setzt Nekrose und Apoptose der Tubuluszellen ein, die sich ablösen und das Lumen verstopfen. Durch den Zellverlust erscheint das verbliebene Epithel abgeflacht und das Lumen dilatiert. Schließlich regeneriert sich das Tubulusepithel wieder, es kommt zu Proliferation und Wiederherstellung der Polarität und des Bürstensaums. (verändert nach Bonventre und Yang [43])

Durch die Zellnekrose kommt es zur Freisetzung von Schädigungs-assoziierten molekularen Strukturen (damage-associated molecular patterns, DAMPs), welche analog zu den pathogen assoziierten molekularen Strukturen (pathogen-associated molecular patterns PAMPs) Inflammation fördern und unterhalten [44]. Dabei wird durch die Inflammation die Regeneration unterdrückt und der Heilungsprozess verzögert [45]. Durch die verzögerte Heilung kommt es nicht zur vollständigen Reepithelialisierung, sondern letztendlich zur Narbenbildung, zur Fibrosierung und damit zum Funktionsverlust. Die Fibrosierung dient dabei der Stabilisierung des Gewebes bei fehlender Regenerationskapazität. Die anhaltende Entzündung, welche beim Eindringen pathogener Erreger als Schutzmechanismus die Verbreitung der Keime verhindert, kann bei der sterilen Inflammation im Rahmen von ischämischen Schädigungen als maladaptive Antwort angesehen werden [46]. Dabei ist das Ausmaß der Funktionseinschränkung letztendlich abhängig von der Anzahl dauerhaft geschädigter Nephrone. Da die Niere keine neuen Nephrone bilden kann, kommt es entweder zur Regeneration des verletzten Nephrons oder zum dauerhaften Verlust des Nephrons mit nachfolgend chronischem Nierenversagen.

Toxische akute Tubulusnekrose

Die akute Tubulusnekrose kann nicht nur durch Ischämie, sondern auch durch verschiedene Nephrotoxine ausgelöst werden. Zu den endogenen Nephrotoxinen zählen Myoglobin und Hämoglobin, Leichtketten-Immunglobuline, Urate und Oxalat. Exogene Nephrotoxine gibt es viele, eine Auflistung der häufigsten ist in Tabelle 3 zu finden.

Tabelle 3: häufige Nephrotoxine

exogen	endogen
Aminoglykoside	Myoglobin (Rhabdomyolyse)
Cisplatin	Hämoglobin (Hämolyse)
Iv-Röntgen-Kontrastmittel	Harnsäure (Tumorlysesyndrom)
Cyclosporine	Leichtketten (Myelom)
NSAIDs	Oxalat (primäre Hyperoxalurie)
Acyclovir	
Oxalat [47]	

Die Nierenschädigung erfolgt über verschiedene Mechanismen. Durch Filtration und Resorption kann es zur Akkumulation nephrotoxischer Substanzen in den Tubuluszellen kommen. Die hohe lokale Konzentration der Pharmaka führt zur Tubuluszellschädigung. Aminoglykoside und Cisplatin verursachten so Schäden vor allem der proximalen Tubuli [48][49]. Iv-Röntgen-Kontrastmittel, Cyclosporine und NSAIDs schädigen hingegen durch Induktion einer renalen Hypoxie. Kontrastmittel steigert zum einen den Sauerstoffverbrauch in der Medulla, zum anderen führt es dort zu einem geringeren Blutfluss [50]. Vorerkrankungen, welche die renale Perfusion negativ beeinflussen, prädisponieren daher den Patienten, eine kontrastmittel-induzierte Nephropathie zu erleiden. Dazu zählen Diabetes mellitus, Herzinsuffizienz, renale Erkrankungen, arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie und hohes Alter. Acyclovir, Ethylene Glykol, Sulfonamide und Methotrexat wirken durch Präzipitation im Tubuluslumen und Obstruktion desselben nephrotoxisch. Acyclovir ist schlecht löslich im Urin. Ein niedriges Urinvolumen bei Volumendepletion und hohe Konzentrationen im Urin vor allem nach iv-Bolusgabe können durch Ausfallen von nadelförmigen Aciclovir-Kristallen in das Tubuluslumen zur Kristallnephropathie und akuter Tubulusnekrose führen [51][52]. Eine indirekte Tubulusnekrose kann durch HMG-CoA-Reduktasehemmer, Kokain-induzierte Muskelschädigung oder Rhabdomyolyse entstehen. Bei der Rhabdomyolyse kommt es durch Schädigung der Muskelzellen zur Freisetzung von Myoglobin. Ursache der Rhabdomyolyse sind nicht nur Medikamente, sondern auch Traumata, exzessive körperliche Belastung, Krampfanfälle oder die maligne Hyperthermie. Sowohl Myoglobin als auch Hämoglobin, welches bei Hämolyse vermehrt freigesetzt wird, enthalten Häm beinhaltende Proteine. Myoglobin und Hämoglobin gelangen ins Tubuluslumen und werden degradiert. Dies setzt die Häm beinhaltenden Proteine frei, die über verschiedene Mechanismen zur akuten Tubulusnekrose führen. Sie können die Tubuli verstopfen, die renale Perfusion herabsetzen und direkt toxisch auf die Tubuli einwirken [53]. Entscheidend für die Entwicklung einer akuten Tubulusnekrose bei Rhabdomyolyse ist die zusätzliche Dehydratation, die verstärkend auf die Vasokonstriktion und Tubulusobstruktion einwirkt [54]. Ein weiteres endogenes Nephrotoxin sind Leichtketten-Immunglobuline. Diese können in großer Menge beim multiplen Myelom freigesetzt werden. Sie werden frei filtriert und im proximalen Tubulus resorbiert. Wird die resorptive Kapazität der Tubuluszellen überstiegen, kommt es zur Anreicherung im Tubuluslumen. Durch Bindung an Tamm-Horsfall-Protein bilden sich

Proteinzyylinder, sogenannte Casts, die der Erkrankung ihren Namen Cast-Nephropathie gaben [55][56]. Die Casts führen zur Obstruktion des Lumens und lösen eine zelluläre Reaktion aus, die zu Entzündung und Fibrose führt [57]. Von der Cast-Bildung betroffen ist vor allem der distale Tubulus, in dem das Tamm-Horsfall-Protein ausgeschieden wird. Eine Schädigung der proximalen Tubuluszellen erfolgt über intrazelluläre Akkumulation und Beeinflussung der Lysosomen [58].

1.3. Tiermodelle der akuten Tubulusnekrose

Um eine bisher fehlende zielgerichtete Therapie der akuten Nierenschädigung zu entwickeln, wird die akute Tubulusnekrose an verschiedenen Tiermodellen erforscht. Bei der akuten Tubulusnekrose sind aktuell drei therapeutische Ansatzpunkte denkbar: erstens die Prävention der akuten Nierenschädigung beziehungsweise das Entfernen des schädigenden Triggers, zweitens die Verringerung des Schädigungsausmaßes durch Eingrenzung der sterilen Inflammation als maladaptive Antwort und drittens die Förderung der Regenerationskapazität [59]. Zur Entwicklung zielgerichteter therapeutischer Mittel ist ein genaues Verständnis der Pathophysiologie der akuten Tubulusnekrose notwendig. Die folgenden Unterkapitel widmen sich daher den verschiedenen verwendeten tierexperimentellen Modellen. Basierend auf den wichtigsten klinischen Ursachen der akuten Nierenschädigung wird über drei Gruppen von Tiermodellen des akuten Nierenversagens berichtet werden, die Ischämie-, die Toxin- und die Sepsis-induzierten. Eine Übersicht der Vor- und Nachteile häufiger Tiermodelle des akuten Nierenversagens ist in Tabelle 4 dargestellt.

1.3.1. Ischämische Schädigung

Zu den ischämischen Tiermodellen der akuten Nierenschädigung zählen unter anderem die warme Ischämie-Reperfusion (IR), welche in dieser Arbeit Verwendung findet, die kalte Ischämie - warme Reperfusion, die isoliert perfundierte Niere und die Kontrastmittel-nephropathie [60].

Warme Ischämie-Reperfusion

In diesem am Häufigsten verwendeten Modell der akuten Tubulusnekrose wird selektiv die Blutversorgung der Niere unterbrochen. Dabei kann entweder der komplette Nierenpedikel oder nur die *Arteria renalis* abgeklemmt werden. Nach einer bestimmten Ischämiezeit wird die Blutversorgung wiedereröffnet und es kommt zur Reperfusion der Niere. Es gibt ein unilaterales und ein bilaterales Modell sowie beim unilateralen Modell zusätzlich die Möglichkeit der gleichzeitigen kontralateralen Nephrektomie, sodass eine Urämie entsteht und auch funktionelle Daten wie die GFR erhoben werden können [61]–[64]. Der grundlegende vorausgehende pathophysiologische Schaden ist die Gewebshypoxie mit nachfolgend veränderter Mikrozirkulation der äußeren Medulla, Inflammation und tubulärer Schädigung hauptsächlich der S3-Segmente. Die Schädigung durch Reperfusion beinhaltet zusätzlich die Formation reaktiver Sauerstoff Spezies (ROS). Dabei hängt die Schädigung von der Ischämiezeit ab, kann aber durch verschiedene andere Faktoren wie zum Beispiel die Temperatur, die Wahl des Narkosemittels oder den Blutdruck beeinflusst werden [65]. Vorteile dieses Modelles sind die Möglichkeit, durch Veränderung der Ischämiezeit unterschiedlich stark ausgeprägten Schaden zu setzen, und die gute Korrelation zwischen funktioneller Schädigung und pathologischen Befunden. Nachteilig ist die eingeschränkte klinische Übertragbarkeit, da es durch Ischämie allein selten zu einer ausgeprägten Tubulusnekrose kommt. Dabei ist der Schaden der S3-Segmente bei den Tieren deutlich ausgeprägter als bei der akuten Tubulusnekrose des Menschen, wo die Nekrose häufig fokal auftritt [66].

Kalte Ischämie – warme Reperfusion

Bei der kalten Ischämie – warmen Reperfusion wird die Niere entnommen, gespült und ähnlich der Transplantation für variable Ischämiezeiten aufbewahrt. Dann wird sie reimplantiert und reperfundiert. Vorteil dieses Modells ist die Analogie zur Nierentransplantation, nachteilig ist jedoch die schwierige experimentelle Durchführung. Generell ist dies ein eher seltener verwendetes und vergleichsweise schlecht studiertes Modell.

Isoliert perfundierte Niere

Die isoliert perfundierte Niere ist ein *ex vivo* Modell, in welchem die gesamte Niere über die *Arteria renalis* mit Blut-ähnlichen, sauerstoffreichen Substanzen unter kontrolliertem Druck perfundiert wird. Dabei kann die GFR und die tubuläre Funktion begleitend überwacht und Urin gesammelt werden und so die Ausscheidung verschiedener Substanzen und die Wirkung auf die renale Funktion untersucht werden [67]. Die isoliert perfundierte Niere eignet sich daher gut für Untersuchungen zur renalen Ausscheidung von Medikamenten, renalem Medikamenten-Metabolismus und Medikamenteninteraktionen. Durch das Isolieren der Niere werden jedoch Faktoren, welche *in vivo* auf die Niere einwirken und eventuell Medikamentenwirkungen oder Ausscheidung beeinflussen oder an der Pathophysiologie des akuten Nierenversagens beteiligt sind, ausgeschlossen.

Kontrastmittelnephropathie

Bei der Kontrastmittelnephropathie wird ein akutes Nierenversagen durch die intravenöse Applikation von Kontrastmittel ausgelöst. Dabei entsteht ein akutes Nierenversagen, wie auch beim Menschen, meist nicht durch alleinige Kontrastmittelapplikation, sondern nur bei gleichzeitigem Vorliegen prädispositionierender Faktoren wie z.B. Herzinsuffizienz, Diabetes oder gleichzeitige Applikation von NSAIDs. Die Schädigung basiert dabei nicht nur auf Nephrotoxizität und tubulärer Obstruktion, sondern auch auf Hypoxie-induzierter tubulärer Schädigung [68], weshalb das Modell in diesem Kapitel Erwähnung findet. Bei diesem Modell ist die gute klinische Übertragbarkeit mit Notwendigkeit des Vorhandenseins von prädispositionierenden Faktoren von Vorteil. Von Nachteil ist die komplizierte Methodik und die bisher fehlende Wirkung therapeutischer Interventionen am Menschen, welche sich im Tiermodell effektiv gezeigt haben [69]. Zusammenfassend sind die unterschiedlichen Tiermodelle in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Vergleich der häufigsten Tiermodelle der akuten Nierenschädigung

Vergleich der häufigsten Tiermodelle der akuten Nierenschädigung											
Modell	Einfach- heit	Reproduzier- barkeit	Kontrolle über äußere Faktoren	Stufen- weise Schädi- gung	Tu- bulär	Me- dullär	Entzünd- lich	Funktionelle Schädigung und Pathologie korrelieren	Vergleich- bare humane Pathologie	Vergleich- bares klinisches Szenario	Klinische Relevanz
Warme Ischämie	+	+		+	+	+	+	+			±
Isoliert perfundierte Niere		+	+	+	+	±					
Kontrastmittel- nephropathie	+				+	+	+	+	+	+	+
Gentamycin	+	+			±				±	+	+
Cisplatin	+	+			+				+	+	±
Glycerol	+	+			+		+				+
Endotoxin	+	+		+			+				
Bakterielle Infusion (iv)	+						+				+
Bakterielle Infusion (ip)	+						+				+
Zoekum- perforation	+						+			+	+

Dargestellt in der ersten Spalte sind die verschiedenen Modelle. In den nachfolgenden Spalten wird mit + signalisiert, dass das jeweilige Merkmal bei diesem Modell vorhanden ist, ± zeigt, dass das Merkmal partiell vorhanden ist und ein fehlendes Zeichen bedeutet, dass das Merkmal bei diesem Modell nicht vorhanden ist. So ist zum Beispiel das Modell der warmen Ischämie Reperfusion einfach und reproduzierbar, es gibt aber kein entsprechendes klinisches Szenario und die klinische Relevanz ist nur partiell vorhanden. [4]

1.3.2. Toxische Schädigung

Von den toxischen Modellen, welche eine akute Tubulusnekrose verursachen, werden im Folgenden die Gentamicin-Nephropathie, die Cisplatin-Nephropathie und die Pigment-Nephropathie kurz besprochen.

Gentamicin-Nephropathie

Durch parenterale Applikation von Gentamicin, einem Antibiotikum, verteilt über meist drei bis sechs aufeinander folgende Tage wird eine akute Tubulusnekrose ausgelöst. Ursächlich scheint eine direkte tubuläre Nephrotoxizität zu sein, wobei die Resorption von Gentamicin im proximalen Tubulus und die Interaktion mit der Atmungskette der Mitochondrien eine pathophysiologische Rolle zu spielen scheint [70]. Vorteil dieser Methode ist die klinische Relevanz und die einfache Reproduzierbarkeit, Nachteil ist jedoch, dass im Vergleich zum

Menschen beim Tier eine wesentlich höhere Gentamicindosis benötigt wird und ein akutes Nierenversagen nur mit ausgeprägtem histologischen Schaden eintritt, obwohl beim Menschen schon minimale tubuläre Veränderungen im Lichtmikroskop funktionelle Schäden auslösen.

Cisplatin Nephropathie

Hierbei wird die nephrotoxische Wirkung des Chemotherapeutikums Cisplatin ausgenutzt. Der Mechanismus der Cisplatin induzierten Nephropathie ist weitestgehend unbekannt, meist kommt es zu einer Tubulusnekrose, welche gehäuft die S3-Segmente der proximalen Tubuli betrifft [71]. Für das Modell der Cisplatin-induzierten Nephropathie wird einmalig Cisplatin intraperitoneal injiziert. Von Vorteil ist hier, dass das Modell einfach und reproduzierbar ist und die Pathologie gut mit der des menschlichen Schadens übereinstimmt. Im klinischen Alltag wird jedoch mittlerweile Cisplatin häufig durch Carboplatin ersetzt, wodurch das Modell an Relevanz einbüßt.

Pigment-Nephropathie

Durch Injektion von Glycerol in Muskelgewebe wird eine Rhabdomyolyse ausgelöst welche zur sogenannten Cast-Nephropathie führt und ein akutes Nierenversagen auslöst. Meist wird den Tieren vor Glycerolinjektion für einen gewissen Zeitraum die Flüssigkeitszufuhr verweigert, sodass die Tiere dehydrieren, um dem klinischen Bild zu entsprechen. Es kommt zur Myoglobinurie, tubulären Nekrose und verstärkten renalen Vasokonstriktion [72]. Der Vorteil dieses Modells ist die Einfachheit, Reproduzierbarkeit und klinische Relevanz mit großer Ähnlichkeit zur menschlichen Rhabdomyolyse. Von Nachteil ist jedoch die Schwere der Erkrankung im Tiermodell und die damit verbundene hohe Letalität.

1.3.3. Sepsis

Eine Sepsis führt häufig zu einer akuten Nierenschädigung, wobei die Nierenschädigung dabei im Rahmen eines Multiorganversagens auftreten kann. Pathophysiologisch spielt eine

generelle Vasokonstriktion mit systemischer Hypotension eine Rolle, gleichzeitig kommt es zu mikrovaskulären Schäden, Inflammation und letztendlich Tubulusnekrose. Zur Sepsisinduktion gibt es verschiedene Tiermodelle, wie zum Beispiel die Injektion von Endotoxinen oder Bakterien oder die Zoekumligatur mit Perforation, bei der operativ das Zoekum mittels Ligatur verschlossen wird und durch Punktion des proximal liegenden Darmes perforiert wird, sodass es zu Austritt von bakterienreichem Stuhl in das sterile Peritoneum und sukzessiver Peritonitis kommt [73]. Dabei erzeugen die genannten Modelle das klinische Bild einer Sepsis und die dadurch ausgelöste akute Nierenschädigung. Das klinische Bild kann jedoch in seiner Ausprägung stark variieren. Gleichzeitig stimmen die Pathophysiologie der Sepsis und die des Tiermodells nicht immer überein. So wird zum Beispiel durch die intravasale Endotoxininjektion eine Vasokonstriktion ausgelöst [74], Charakteristikum einer Sepsis ist jedoch eine Vasodilatation.

1.4. Einfluss der Temperatur auf die ischämische Schädigung

Der bei der ischämischen Reperfusion gesetzte Schaden lässt sich durch verschiedene Faktoren beeinflussen. Dies ist zum Teil gewünscht, so kann man beispielsweise wie beschrieben durch variable Ischämiezeiten das Ausmaß der Schädigung steuern und so zum Beispiel reversible und irreversible Schädigungen induzieren. Gleichzeitig vermindern die Variablen die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Hierzu zählen unter anderem das Alter der Tiere, das Geschlecht, der Hydrierungsstatus, die Fähigkeiten des Operators, die Operationsdauer, das operative Trauma, das Anästhetikum und die Temperatur. Dabei ist die Temperatur gleichzeitig der wohl wichtigste Einflussfaktor auf das Ausmaß der ischämischen Schädigung [75] und wird deshalb in dieser Arbeit untersucht.

Mechanismen der Temperaturregulation

Mäuse gehören, genau wie Menschen, zu den homoithermen Organismen, das heißt, dass sie ihre Körperkerntemperatur auch bei deutlich niedrigeren oder höheren Umgebungstemperaturen konstant halten. Daten zur normalen Körperkerntemperatur von

Mäusen in der Literatur finden sich wenige. Notwendig ist die Temperaturkonstanz, da bei Temperaturen von größer 40°C Proteine ihre Struktur verändern und denaturieren. Bei zu niedrigen Temperaturen nimmt die kinetische Energie der Enzyme ab, was die Stoffwechselaktivität dämpft und so das generelle Aktivitätsniveau herabsetzt. Die wichtigsten Mechanismen zur Temperaturregulation sind dabei Thermogenese, Isolation, periphere Vasodilatation und Schweißsekretion.

Während einer Narkose ist die Temperaturregulation der Maus eingeschränkt. Aufgrund der im Vergleich zur Körpergröße großen Körperoberfläche sind Mäuse für eine Hypothermie prädispositioniert [76]. Äußere Faktoren wie die Raumtemperatur [77], Alkohol zur Desinfektion und offene Wundverhältnisse führen zu einem weiteren Wärmeverlust [78]. So fällt die Körperkerntemperatur der Mäuse in Narkose ohne Wärmezufuhr signifikant [76]. Bewusste physiologische Antworten des Körpers auf Hypothermie wie das Aufsuchen von warmen Plätzen oder das Einrollen des Körpers sind in Narkose nicht möglich. Die Thermoregulation wird auf autonome Antworten wie Vasokonstriktion und Muskelzittern reduziert [79]. Während entsprechende Daten bei Mäusen fehlen, konnte beim Menschen gezeigt werden, dass in Vollnarkose der Schwellenwert der thermoregulatorischen Vasokonstriktion auf ungefähr 34,5°C herabsinkt [80], [81]. Gleichzeitig steigt der Schwellenwert, an dem die Schweißproduktion und Vasodilatation zur Temperatursenkung beginnt, sodass der Bereich, in dem die Temperaturregulation nicht greift, erweitert wird [82]. Wichtig ist die Erhaltung der Körperkerntemperatur beim Menschen und der Maus jedoch, da perioperative Komplikationen durch Hypothermie häufig sind. Sie umfassen postoperatives Zittern mit Ansteigen des Grundumsatzes [83], Gerinnungsstörungen [84] Wundheilungsstörungen und verlängerte Wirkung von Pharmaka [85].

Effekt der Temperatur auf die ischämische Schädigung

Der Effekt der Temperatur auf ischämische Schädigungen ist bekannt und wird bereits therapeutisch benutzt. 1937 beschrieben Bickford und Winton erstmals ein längeres Überleben der kalten isolierten Niere eines Hundes mit konstanteren Eigenschaften im Vergleich zur warmen Niere [86]. In der Transplantationsmedizin wird Hypothermie als protektiver Effekt auf den Ischämie-Reperfusion-Schaden bereits genutzt. Ziel ist es, die Stoffwechselaktivität im Transplantat zu reduzieren, indem die Niere auf +4°C bis +8°C

abgekühlt wird. Dabei senkt die Hypothermie den metabolischen Umsatz und den ATP-Verbrauch [87]. So konnte 1963 gezeigt werden, dass durch das Abkühlen der zu transplantierenden Niere auf 4°C selbige bis zu 12 Stunden ihre Funktion erhält [88]. Durch die herabgesetzte Aktivität der Na^+/K^+ -Pumpe kommt es während der Hypothermie allein im Verlauf jedoch zum Natriumeinstrom in die Zelle und zum letalem Anschwellen der Zelle. Um dieses Problem zu umgehen, entwickelte Collins 1969 die sogenannte Collins'sche Lösung, welche der intrazellulären Zusammensetzung nahezu identische Mengen an Natrium und Kalium enthält sowie große Mengen an Glukose [89]. Damit konnte eine deutliche Verlängerung der kalten Ischämiezeit erreicht werden und die Lösung wird in veränderter Zusammensetzung noch heute verwendet.

Therapeutische Hypothermie

Therapeutische Hypothermie umfasst die kontrollierte Reduktion der Körperkerntemperatur mit dem Ziel, ein gefährdetes Organ zu schützen. Bisher wird die therapeutische Hypothermie hauptsächlich nach zerebralen Schädigungen, wie zum Beispiel nach Reanimation [90] oder hypoxischer ischämischer Enzephalopathie von Neonaten [91] benutzt. Ziel ist es, den sekundären Schaden nach erfolgtem primären Schaden abzuschwächen und so insgesamt die Beeinträchtigung der Organfunktion zu begrenzen und den Schaden zu verringern. Dabei kommt es durch die Hypothermie zu einem verminderten Metabolismus und somit vermindertem Sauerstoffverbrauch. Gleichzeitig wird durch Hypothermie die Ischämie-induzierte Entzündung unterdrückt [92] und die Produktion von freien Radikalen reduziert [93]. Hypothermie reduziert die durch Ischämie und Reperfusion induzierte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke [94] genauso wie die vaskuläre Permeabilität [95]. So kann durch verschiedene Pathomechanismen der ischämische Schaden durch Hypothermie reduziert werden.

Definition eines Zielbereiches der murinen Körperkerntemperatur während der IR

Wie oben aufgeführt, hat Hypothermie einen protektiven Effekt auf die ischämische Schädigung. Daher ist es bei der beabsichtigten Induktion eines IR-Schadens notwendig, die Körperkerntemperatur der Maus in einem zu definierenden Rahmen konstant zu halten. Die

in der Literatur beschriebenen rektal gemessenen Körperkerntemperaturen der Mäuse liegen zwischen 36.5°C und 38.5°C [76], [96]–[98], variieren jedoch zwischen verschiedenen Mausstämmen [99] und sind auch vom Alter und Geschlecht der Tiere abhängig [96]. Jackson Laboratory gibt eine mittlere Körperkerntemperatur der männlichen C57BL/6J von $38.2 \pm 0.28^\circ\text{C}$ an [100]. Auch die in unserem Labor gemessenen Körperkerntemperaturen in Ruhe lagen im oben beschriebenen Bereich. Auf dieser Grundlage wurde als Zielbereich der Körperkerntemperatur der Mäuse während der folgenden Versuchsreihe eine Temperatur zwischen 36.5°C und 38.5°C definiert.

1.5. Zielsetzung und Hypothese

Im Vergleich zu anderen Labors hat sich gezeigt, dass im bisher verwendeten Versuchsaufbau der ischämischen Reperfusions-Schädigung (*ischemic reperfusion injury* - IRI) deutlich längere Ischämiezeiten nötig waren, um einen vergleichbaren Schaden zu erzielen. Für das Ausmaß der Schädigung nach IRI sind sowohl die Körperkerntemperatur der Versuchstiere während der Ischämie als auch die Ischämiedauer von Bedeutung. Verlässliche experimentelle Bedingungen zur Generierung von reproduzierbaren Daten setzen voraus, dass beide Einflussgrößen strikt regulierbar sind. Daher ist es die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit, eine Methodik zu entwickeln, die bei gleicher Operationseffizienz die Körpertemperatur der Versuchstiere konstant hält, sodass sie als unregulierbare Variable entfällt und die Schadensregulierung ausschließlich über die Dauer der Ischämie gesteuert werden kann.

Um dies zu erreichen, wurde ein Zielbereich definiert, in welchem die Körperkerntemperaturen der Mäuse während der IR liegen sollten. Wir stellten die Hypothese auf, dass sich die Temperatur mit Hilfe von online Messungen validieren und bei $37.5 \pm 1^\circ\text{C}$ kontrollieren lässt. Als Folgehypothese nahmen wir an, dass durch eine stabile und damit in unserem Fall höhere Durchschnittskörperkerntemperatur der Mäuse das Ausmaß der ischämischen Schädigung zunimmt. Gleichzeitig sollte eine konstante Körperkerntemperatur zu einer eindeutigen Abhängigkeit der Schädigung von der Ischämiezeit führen, und zwar als Indiz für konstante Variablen. Ziel ist dabei eine Reduktion der Variabilität und dadurch Minimierung von Tierzahlen für IRI Versuche.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Pipetten

Pipetten Pipetman	Gilson, Middleton, WI, USA
Multikanalpipette	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipettenspitzen 1 - 1000 µl Sapphire	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Pipettenspitzen epT.I.P.S	Eppendorf AG, Hamburg, D

Waagen

BP 110 S	Sartorius, Göttingen, D
Silver Crest	Millomex, Bedfordshire, UK

Zentrifugen

Zentrifuge Heraeus, Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau, D
Centrifuge 5418 C	Eppendorf, Hamburg, D

Real-time PCR

Nano drop	PEQLAB Biotechnology, Erlangen D
LightCycler 480 Real-Time PCR System	Roche, Basel, CH
Klebefolie	Roche, Basel, CH
LightCycler 480 Multiwell-Platte 96	Roche, Basel, CH
ULTRA-Turrax-T25-Homogenisator	Ika-Werke, Staufen, D

Mikroskope

Lichtmikroskop Leitz DMRBE	Leica Microsysteme, Bensheim, D
Digitale Kamera DC 300F	Leica Microsysteme, Cambridge, UK

IR

Bepanthen Augen und Nasensalbe	Bayer, Leverkusen, D
Nadeln BD Microlance 26 G x ½	BD, Louth, Ireland

Mersilene, Polyester, 2-0
 Operationsbesteck
 Skalpelle No. 20
 Spritze 1 ml
 Sterile Mullkompressen 5x5cm
 Yasargil Aneurysm Clip
 Yasargil Clip Applying Forceps

Ethicon, Belgien
 Miltex, New Jersey, US
 Feather Safety Razor Co., Japan
 BD Plastipak, Madrid, Spain
 NOBA Verbandmittel, Wetter, D
 Medicon, Tuttlingen, D
 Medicon, Tuttlingen, D

Temperaturkontrolle

Dasy Lab Software
 Egg Incubator - Octagon 20 Advance
 Infrared R95E 2E
 Temperature Control Unit HB 101/2
 Temperature sensor for mice Type T
 Thermes USB
 Eppendorf Mixer 5432

Measurement Computing, Norton, USA
 Brinsea Products, Stanford, UK
 Philipps, Herrsching, D
 Panlab Bioresarch, Barcelona, Spanien
 Physitemp Instruments Inc, Clifton, USA
 Physitemp Instruments Inc, Clifton, USA
 Eppendorf, Hamburg, D

Sonstiges

C57BL/6 Wildtyp-Mäuse
 Eppendorf-Gefäße 1,5 ml
 Falcons 15ml, 50ml
 Macrolon Typ II L Käfige mit Filterdeckel
 Superfrost ultra plus Objektträger
 Thermomixer 5436
 Vortex Genie 2

Charles River Laboratories, Sulzfeld, D
 TPP, Trasadingen, CH
 BD, Heidelberg, D
 Bioscape, Emmendingen, D
 Thermo Scientific, Dreieich, D
 Eppendorf, Hamburg, D
 Bender & Hobein AG, Zürich, CH

2.1.2. Chemikalien, Puffer und Lösungen

IR

Buprenorphin (Buprenovet)
 Naloxon Inresa 0,4mg
 Midazolam-ratiopharm 5mg/ml
 Flumazil Hikma 0,5mg/5ml
 Antisedan (Atipamezolhydrochlorid 5mg/ml)
 Dormitor 1mg/ml
 Fentanyl-Janssen 0,1mg

Bayer, Leverkusen, D
 Inresa-Arzneimittel, Freiburg, D
 Ratiopharm, Ulm, D
 Hikma Pharma, Nieder-Olm, D
 Pfizer GmbH, Karlsruhe, D
 Pfizer GmbH, Karlsruhe, D
 Janssen-Cilag, Neuss, D

NaCl 0.9%

Merck, Darmstadt, D

RNA-Isolation, cDNA-Synthese und real-time PCR

Ethanol

Merck, Darmstadt, D

PureLink RNA Mini Kit

Ambion, Darmstadt, D

RNasin (40 U/μl)

Promega, Mannheim, D

β-Mercaptoethanol

Roth, Karlsruhe, D

RNase free Spray

Gene Choice, Frederick, USA

Superscript II

Invitrogen, Karlsruhe, D

Linear Acrylamid

Ambion, Darmstadt, D

DTT (0,1M)

Invitrogen, Karlsruhe, D

dNTPs (25nM)

GE Healthcare, München, D

Hexanucleotide

Roche, Mannheim, D

5x First strand Buffer

Invitrogen, Karlsruhe, D

MgCl₂ (25mM)

Fermentas, St. Leon-Rot, D

10x Taq Puffer without detergent

Fermentas, St. Leon-Rot, D

SYBR Green Dye detection

Applied Biosystems, Norwalk, USA

BioStab PCR Optimizer

Bitop, Witten, D

Taq DNA Polymerase

New England BioLabs, Ipswich, USA

Mastermix für real-time PCR (10ml)

Tag Puffer 10x without detergent (2ml)

dNTP 25mM (150μl)

BioStab PCR optimizer (4ml)

Bovines Serumalbumin, 20mg/ml (200μl)

SYBR GreenI (40μl)

MgCl₂ 25mM (2,4ml)

H₂O (1210μl)

Histopathologische Methoden

Paraformaldehyd

Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Perjodsäure Schiff

Roth GmbH, Karlsruhe, D

Schiff-Reagenz

Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Xylol

Merck, Darmstadt, D

Formaldehydlösung 37 %

Merck, Darmstadt, D

Methanol

Merck, Darmstadt, D

Methylgrün	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
3,3'-Diaminobenzidine	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt, D
2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol (MDP 30)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, D

2.1.3. Software

Dasy Lab Software	Measurement Computing, Norton, USA
Image J	http://rsb.info.nih.gov/ij/disclaimer.html
R statistics	R Development Core Team
GraphPad PRISM	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
Mendeley Desktop	Mendeley Ltd., London, UK

2.1.4. Oligonukleotid-Primer für die real-time PCR

Tabelle 5: Verwendete real-time PCR Primer zur Analyse der Expression relevanter Gene.

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	Accession Nummer
Murines CXCL-2	CGGTCAAAAAGTTTGCCTTG	TCCAGGTCAGTTAGCCTTGC	NM_009140.2
			NM_001243092.1
Murines a-GST	CAATGGCCGGGAAGCCCGTG	CTTCAAACCTCCACCCCTGCTGC	NM_001122660.1
			NM_008181.3
			NM_008182.3
Murines p-GST	CGCAGCACTGAATCCGCACC	ACACCGCCCTCGAACTGGGAA	NM_013541.1
Murines IL-6	TGATGCACTTGCAGAAAACA	ACCAGAGGAAATTTCAATAGGC	NM_031168.1
Murines KIM-1	TCAGCTCGGGAATGCACAA	TGGTTGCCTTCCGTGTCTCT	NM_001166632.1
			NM_001166631.1
			NM_134248.2
Murines MCP-1	CCTGCTGTTACAGTTGCC	ATTGGGATCATCTTGCTGGT	NM_011333.3
Murines NGAL	AATGTCACCTCCATCCTGGT	ATTTCCCAGAGTGAAGTGGC	NM_008491.1
Murines TNF a	ATGGGCTACAGGCTTGCTACTC	CTCTTCTGCCTGCTGCACTTTG	NM_013693.3
18s	GCAATTATTCCCATGAACG	AGGGCCTCACTAAACCATCC	NR_003278

Verwendete Primer zur real-time PCR. CXCL-2: chemokine-ligand-2, GST: Glutathione-S-transferase, IL-6: Interleukin-6, KIM-1: Kidney injury molecule-1, MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1, NGAL: neutrophil gelatinase-associated lipocalin, TNF: tumor necrosis factor

2.1.5. Antikörper

Immunhistochemische Färbungen

Lotus tetragonolobus Lectin

Vector Labs, Burlingame, USA

rat anti-mouse Ly-6B.2

Serotec, Oxford, UK

2.2. Tierexperimentelle Methoden

2.2.1. Tierzucht und Tierhaltung

Für diese Studie wurden von Charles River bezogene C57Bl/6N Mäuse verwendet. Alle Versuche wurden, wenn nicht anders beschrieben, mit einer Gruppengröße von 5 Mäusen durchgeführt. Die Mäuse wurden in Macrolon Typ II L Käfigen mit Filterdeckel in Gruppen a 5 Mäusen mit unbegrenztem Zugang zu Nahrung und Wasser in einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Käfige, Streu, Futter, Wasser und die Nestwatte wurden mittels Autoklav sterilisiert. Alle tierexperimentellen Verfahren wurden nach den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und waren zuvor durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

2.2.2. Induktion einer transienten Ischämie und Reperfusion

Zur Induktion einer akuten Nierenschädigung wurde an 6 bis 8 Wochen alten C57Bl/6N Mäusen eine temporäre Abklemmung des Nierenhilus mit Hilfe von Yasargil Aneurysmen-Clips vorgenommen. Dafür wurden die Mäuse gewichtsadaptiert vollnarkotisiert, um Analgesie, Amnesie und Hypnose zu erreichen. Verwendet wurde eine vollantagonisierbare Mischung aus Medetomidin 0.5 mg/kg, Midazolam 5 mg/kg und Fentanyl 0,05 mg/kg. Die Gabe der Narkosemischung erfolgte intraperitoneal. Zum Schutz vor Austrocknung der Augen wurde Bepanthen Augensalbe benutzt. Die chirurgische Toleranz lässt sich durch das Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes verifizieren, was nach ca. 10 Minuten beobachtet werden konnte. Temperatursonden wurden mit Bepanthen bedeckt, rektal eingebracht und am Schwanz mit Klebeband fixiert. Zur Operation wurden die Mäuse je nach Experiment seitlich auf unterschiedlichen Flächen gelagert. Dort wurden sie mit Klebeband an den Extremitäten vorsichtig fixiert, um ein Verrutschen während der Operation zu verhindern. Die Flanke wurde im Operationsgebiet mit 70%igem Ethanol desinfiziert und es erfolgte eine Hautinzision von ca. 1 cm Länge mit darauffolgender stumpfer Präparation des Peritoneums und Inzision desselben von ebenfalls 1 cm Länge. Die Niere wurde in ihrer Kapsel dargestellt und mittels einer anatomischen Pinzette stumpf freipräpariert. Im weiteren Verlauf wurde die Niere vor das Peritoneum und die Kutis mobilisiert. Der Nierenhilus wurde freigelegt und die gesamte Gefäßversorgung der Niere mittels Mikroaneurysmaklemme unter

Zuhilfenahme des dazugehörigen Adapters abgeklemmt. Auf einen Farbumschlag der Niere als Anhalt für eine vollständige Ischämie, welcher sich bei erfolgreichem Abklemmen nach wenigen Sekunden einstellt, wurde geachtet. Die Niere wurde dann mit einer mit warmem Natriumchlorid befeuchteten Kompresse abgedeckt um Austrocknung zu vermeiden. Die Maus wurde während der Ischämiezeit je nach Experiment gelagert. Die Ischämiedauer variiert zwischen den Experimenten und wird an entsprechender Stelle im Text vermerkt.

Nach Ablauf der Ischämiezeit wurde die Mikroaneurysmaklemme entfernt und so die Perfusion der Niere wieder hergestellt. Ein Farbumschlag von dunkelrot zu hellrot zeigt die wiederhergestellte Perfusion an. Die Niere wurde vorsichtig nach intraperitoneal reponiert. Zum Ausgleich des intraoperativen Flüssigkeitsverlustes wurden 200 µl isotone Natriumchloridlösung 0.9% in die Bauchhöhle getropft. Das Peritoneum und im Anschluss daran auch die Haut wurden mit Einzelknopfnähten verschlossen. Zum Aufwecken der Tiere wurde eine Mischung aus Atipamezol 2.5 mg/kg, Flumazenil 0.5 mg/kg und Naloxon 1.2 mg/kg, Antagonisten von Medetomidin, Benzodiazepanen und Opioiden respektive ebenso wie Buprenorphin 0.05mg/kg zur postoperativen Analgesie subkutan ins Nackenfell gespritzt. Die Temperatursonden wurden entfernt und die Mäuse postoperativ für mehrere Stunden im Käfig mit einer Wärmelampe beschienen und regelmäßig begutachtet. Am ersten postoperativen Tag erfolgte die orale Gabe von Metamizol 200 mg/kg oral alle 6 Stunden zur Analgesie oder nach Bedarf in Absprache mit der verantwortlichen Veterinärmedizinerin.

2.2.3. Organentnahme

24 Stunden nach der Ischämieinduktion wurden die Mäuse mittels zervikaler Dislokation euthanasiert. Mittels medianer Laparotomie wurden die Nieren beidseits entnommen. Die Kapsel wurde entfernt und die Nieren wurden gewogen. Die Nieren wurden in drei Teile geteilt. Das Mittelstück wurde zur histologischen Schnittpräparation für 24 Stunden in 4%ige Formalinlösung gelegt, der obere und untere Nierenpol zur späteren RNA-Bestimmung in 1ml RNAlater gegeben und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.4. Wärmeversorgung

Messtechnik

Zur Messung der Körperkerntemperatur der Mäuse wurden Rektalsonden von Physitemp Instruments verwendet, welche mit Bepanthen benetzt und rektal appliziert wurden und kontinuierlich die Körperkerntemperatur der Mäuse messen. Dabei wurden drei Messungen pro Sekunde durchgeführt und automatisch gemittelt. Mittels Dasy Lab Software wurden die gemessenen Werte pro Sekunde gespeichert und graphisch sichtbar gemacht.

Materialuntersuchungen

Zur Temperaturmessung der Wärmeplatte 1 (Temperature Control Unit HB 101/2 von Panlab Bioresearch) wurden 5 Temperatursonden entlang der Wärmeplatte befestigt und für 30 Minuten bei eingestellten 38°C und dann bei 39°C die räumliche Verteilung der Temperatur auf der Wärmeplatte gemessen. Selbiges wurde auch für Wärmeplatte 2 (Thermomixer 5436 von Eppendorf, abgedeckt mit Alufolie) durchgeführt. Hierfür wurde die Temperatur der Wärmeplatte auf 40°C eingestellt. Eine zweite Messung wurde nach Einschalten der Wärmelampe im Abstand von 37 cm zur Wärmeplatte durchgeführt. Die Temperatur der Wärmekammer (Egg Incubator - Octagon 20 Advance von Brinsea Products) wurde entlang ihrer Fläche bei eingestellten 37.5°C gemessen. Dafür wurde eine Temperatursonde durch den Lüftungsschacht eingeführt und nach 30 Minuten die Position verändert, sodass ebenfalls 5 Messungen an verschiedenen Positionen durchgeführt wurden. Der Versuch wurde nach Auskleidung der Wärmekammer mit Alufolie und Streu unter sonst gleichen Bedingungen wiederholt.

Untersuchungen in Narkose

Die Mäuse wurden wie oben beschrieben narkotisiert. Sie wurden je nach Versuchsprotokoll gelagert. In der Schnitt- und Nahtphase wurden die Mäuse an der Flanke mit 70%igen Alkohol befeuchtet, im Gegensatz zur IR wurde zur Simulation kein Schnitt durchgeführt. Während der simulierten Ischämiezeit wurde eine feuchte Kompresse auf die Flanke der Mäuse gelegt. Postoperativ wurde die Narkose wie oben beschrieben antagonisiert.

Beim bisher etablierten Versuchsaufbau wurden die Mäuse präoperativ unter einer Wärmelampe in einem Käfig gelagert. Die Schnitt- und Nahtphase erfolgte auf einem Abdecktuch ohne weitere Wärmezufuhr. Während der Ischämiezeit lagen die Mäuse auf Wärmeplatte 2 bei eingestellten 40°C unter einer Wärmelampe im Abstand von 37 cm. Beim ersten Versuch in Narkose wurde eine Maus narkotisiert und für die Schnitt- und Nahtphase auf Wärmeplatte 2 mit eingestellten 40°C gelagert. Der Versuchsaufbau während der anderen IR-Simulationsphasen wurde analog zum vorherigen Experiment durchgeführt. Für Versuch Nr. 2 wurde selbige Maus wie im Versuch Nr. 1 beschrieben gelagert, mit dem Unterschied, dass die Wärmeplatte 2 auf 43°C eingestellt wurde. Versuch Nr. 3 wurde mit 3 Mäusen durchgeführt, die präoperativ für 10 Minuten bei 37.5°C in der Wärmekammer gelagert wurden, während der Schnitt- und Nahtphase auf Wärmeplatte 2 bei eingestellten 55°C lagen und während der Ischämiezeit auf Wärmeplatte 2 eingestellt auf 46°C unter der Wärmelampe im Abstand von 37 cm. Versuch 4 unterschied sich zu Versuch 3 lediglich während der Ischämiezeit; während derer wurden die Mäusen in der Wärmekammer bei eingestellten 39.2°C gelagert. Die Geräteeinstellungen der Versuche sind in Tabelle 6 aufgezeichnet.

Tabelle 6: Geräteeinstellungen in den vier Phasen der simulierten IR.

Nr.	Präoperativ	Schnitt	Ischämiezeit	Naht
0	Wärmelampe		Wärmeplatte 2 40°C und Wärmelampe 37cm	
1	Wärmelampe	Wärmeplatte 2 40°C	Wärmeplatte 2 40°C und Wärmelampe 37cm	Wärmeplatte 2 40°C
2	Wärmelampe	Wärmeplatte 2 43°C	Wärmeplatte 2 40°C und Wärmelampe 37cm	Wärmeplatte 2 43°C
3	Wärmekammer 37.3°C	Wärmeplatte 2 55°C	Wärmeplatte 2 46°C und Wärmelampe 53cm	Wärmeplatte 2 55°C
4	Wärmekammer 37.5°C	Wärmeplatte 2 55°C	Wärmekammer 39.2°C	Wärmeplatte 2 55°C

Angegeben sind die Einstellungen der Geräte, die für die Versuche benutzt wurden. Die Wärmelampe wurde im Abstand von 37 cm zur Wärmeplatte angebracht. Versuch Nr. 0 ist das bisher etablierte Modell. Die Mäuse wurden während der verschiedenen Phasen (präoperativ, Schnitt, Ischämiezeit und Naht) wie in der Tabelle beschrieben mit Wärme versorgt. Präoperativ wurden sie entweder im Käfig unter einer Wärmelampe, oder in der Wärmekammer gelagert. Während der Schnitt- und Nahtphase befanden sie sich entweder auf einem Abdecktuch ohne Wärmezufuhr oder auf der Wärmeplatte 2 mit den in der Tabelle gezeigten Temperatureinstellungen. Während der Ischämiezeit wurden sie entweder auf Wärmeplatte 2 unter der Wärmelampe oder in der Wärmekammer gelagert.

Zwischen Versuch Nr. 2 und Nr. 3 wurde die Temperatureinstellung der Wärmeplatte sowie der Wärmekammer in Kombination mit der Wärmelampe untersucht, bei der 37.5°C warme Mäuse weder abkühlen noch aufheizen. Dafür wurden 37.5°C warme Mäuse auf der Wärmeplatte gelagert und die Temperatur dieser so oft adjustiert, bis die Temperatur der Mäuse konstant bei 37.5°C blieb. Selbiges wurde nach Hinzufügen der Wärmelampe wiederholt. Die Einstellungen in Versuch Nr. 3 wurden dementsprechend gewählt.

Wärmeversorgung bei der IR

Die in Versuch Nr. 4 der Untersuchungen in Narkose verwendeten Einstellungen wurden für die IR optimiert. Es wurde Wärmeplatte 1 für die Wärmezufuhr während der Schnitt- und Nahtphase benutzt. Diese wurde auf 37°C eingestellt. Präoperativ wurden die Mäuse 10 Minuten in der Wärmekammer gelagert, die männlichen bei 37°C, die weiblichen bei 37.3°C. Während der Ischämiezeit wurden die männlichen Mäuse bei 37.8°C und die weiblichen bei 38.3°C in der Wärmekammer gelagert (s. Tabelle 7). Die Niere der Mäuse wurde nach dem Abklemmen zur Ischämiezeit nach intraperitoneal verlagert und mit einer feuchten Kompresse bedeckt. Die Menge an Natriumchloridlösung, die auf die während der Ischämiezeit die Flanke der Maus bedeckende Kompresse gegeben wurde, betrug 300 µl, die präoperative Zeit in der Wärmekammer 10 Minuten.

Tabelle 7: Temperatureinstellungen während der verschiedenen Phasen der IR (präoperativ, Schnitt, Ischämiezeit und Naht).

Geschlecht, Alter (Wochen)	präoperativ	Schnitt	Ischämiezeit	Naht
männlich, 8.7	Wärmekammer 37°C	Wärmeplatte 37°C	Wärmekammer 37.8°C	Wärmeplatte 37°C
weiblich, 6.4	Wärmekammer 37.3°C	Wärmeplatte 37°C	Wärmekammer 38.3°C	Wärmeplatte 37°C

Für die leichteren jüngeren weiblichen Mäuse sind andere Temperatureinstellungen zu wählen als für die schwereren männlichen. Die exogene Wärmezufuhr der männlichen Mäuse ist geringer. Dargestellt sind die Einstellungen der Geräte während der verschiedenen Phasen. Es wurde Wärmeplatte 1 benutzt.

2.3. Transkriptionsanalyse

2.3.1. RNA Isolation

Die Isolierung von ribonucleic acid (RNA) aus Nierengewebe wurde mittels des *Pure Link RNA Mini Kit* von Ambion und des dazugehörigen Protokolls durchgeführt. Vor Arbeitsbeginn erfolgte die Reinigung des Arbeitsplatzes mittels 70%igem Ethanol und *RNAse free* von Gene choice zur Herstellung eines RNAse-freien Arbeitsplatzes. 30 mg des in RNAlater aufbewahrten Nierengewebes wurden mit 600 µl des mitgelieferten Lysis Buffer, welcher zuvor mit 1% β-Mercaptoethanol versetzt wurde, in ein 2ml Eppendorf Gefäß gegeben. Anschließend wurde das Gewebe mittels des ULTRA-Turrax-T25-Homogenisator (Ika-Werke, Staufen, Deutschland) auf Stufe 4 lysiert und für 10 Sekunden homogenisiert. Falls nötig wurde der Vorgang wiederholt, bis keine Gewebestücke mehr sichtbar waren. 350 µl des Homogenisat wurden mit 350 µl 70%igem Ethanol vermischt und gevortext. Die 700 µl Lysat wurden auf die mitgelieferte Säule aufgetragen und für 15 Sekunden bei 12.000 relative centrifugal force (rcf) zentrifugiert. 700 µl des mitgelieferten Wash Buffer I wurden auf die Säulen gebracht und erneut für 15 Sekunden bei 12.00 rcf zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und das Sammelröhrchen durch ein Neues ersetzt. Vom ebenfalls mitgelieferten Wash Buffer II wurden 500 µl auf die Säulen gegeben und erneut mit gleicher Umdrehung und Dauer wie oben beschrieben zentrifugiert. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal wiederholt. Nach jeder Zentrifugation wurde das Filtrat verworfen. Um die Membran zu trocknen, wurde die Säule für 2 Minuten bei 12.00 rcf zentrifugiert. 35 µl des mitgelieferten Rnase freien Wassers wurden mittig auf die Membran gegeben und nach einer Inkubationszeit von einer Minute bei obiger Umdrehung für weitere zwei Minuten zur Auslösung der RNA zentrifugiert. Die RNA befand sich dann im Auffangröhrchen und die Säule konnte entsorgt werden. Die isolierte RNA konnte bei -80°C aufbewahrt oder direkt weiterverarbeitet werden.

2.3.2. RNA Quantifizierung mittels Spektrometrie

Die Bestimmung des RNA-Gehaltes erfolgte durch Messung der optischen Dichte mittels Spektrometrie. 2 µl der isolierten RNA wurden auf die Messoberfläche des Nano drop pipettiert und die Konzentration in ng/µl sowie die Reinheit anhand der Ratio von 260 nm zu

280 nm bestimmt [101]. Werte zwischen 1.8 und 2.2 sind in der Literatur als ausreichende Reinheit der RNA ohne größere Verunreinigung durch Proteine beschrieben [102] und können zur weiteren Auswertung benutzt werden. Aus der Konzentration wurde die Menge errechnet, die 2 µg RNA enthält und zur weiteren Umschreibung in cDNA benötigt wird.

2.3.3. Umschreibung der mRNA zu cDNA

Zur Analyse der messenger Ribonukleinsäure (mRNA) Expression mittels PCR muss die RNA mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden. Das aus der RNA-Konzentration berechnete Volumen, welches 2 µg RNA enthält, wurde in ein 1.5 ml Eppendorf Gefäß pipettiert. Dies wurde mit RNase freiem Wasser verdünnt, um ein einheitliches Gesamtvolumen vom 15 µl zu erreichen. Obige Schritte wurden für die Negativkontrolle wiederholt, dabei wurde anstelle der RNA-haltigen Lösung RNase freies Wasser verwendet. Eine Reagenzmischung mit den in Tabelle 8 aufgezeigten Bestandteilen und Volumina wurde angelegt. Für die cDNA-RT+ wurde Superscript II hinzugegeben. Die 15 µl RNA-Lösung wurden jeweils mit 7.45 µl des Reagenzgemesches vermischt, sodass jede Probe ein Gesamtvolumen von 22,45 µl hatte, welches 2 µg RNA enthält. Für jede Probe wurde eine Negativkontrolle angefertigt, um zu verifizieren, dass Amplifikationen, die während der nachfolgenden PCR Reaktion entstehen, auf die synthetisierte cDNA zurückzuführen sind und nicht durch Kontamination mit genomischer DNA entstanden sind.

Tabelle 8: Zusammensetzung der Reagenzmischung zur Herstellung der cDNA.

Bestandteile	Volumen (µl)
5 Fc Buffer	4,5
DTT	1
dNTPs 25 mM	0,45
RNAsin	0,5
LinAcril (15 µg/ml)	0,25
Hexanucleotide	0,25
Superscript II oder RNase freies Wasser	0,5
Gesamtvolumen	7,45

Die Reagenzien werden mit den angegebenen Volumina zusammengemischt. Superscript II wird als letztes hinzugeführt. Vor Zugabe von Superscript II wird die Reagenzmischung gevortext. Für die Negativkontrollen (RT-) wird anstelle von Superscript II RNase freies Wasser verwendet.

Die Proben wurden für 90 Minuten bei 42°C inkubiert und für weitere 5 Minuten zur Beendigung der Reaktion auf 85°C erhitzt. Die synthetisierte cDNA wurde herunterzentrifugiert und bei -20°C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

2.3.4. Real-time PCR

Die real-time Polymerase Chain Reaction (rt PCR) gehört zu den molekularbiologischen Methoden und dient zur Vervielfältigung von DNA in vitro. 1983 wurde sie von K. Mullis entdeckt, wofür er 1993 den Nobelpreis erhielt [103]. In drei sich in Zyklen wiederholenden Schritten, der Denaturierung, dem Annealing (Primerhybridisierung) und der Amplifikation (Elongation), findet die Vervielfältigung der DNA statt. Die hohen Temperaturen (ca. 95°C) bei der Denaturierung führen zu einer Trennung der DNA-Doppelstränge zu Einzelsträngen. Beim Annealing lagern sich die Primer an die komplementären DNA-Stränge an. Dabei wird die optimale Temperatur zur Anlagerung der Primer gewählt. Diese ist abhängig von der Länge und Sequenz des Primers und wurde für diese Arbeit um ca 60°C gewählt. Bei der Amplifikation synthetisiert die Polymerase komplementäre Stränge beginnend am Primer. Die Temperatur ist dabei abhängig vom Arbeitsoptimum der Polymerase und liegt zwischen 68 – 72°C.

Die real time PCR, auch quantitative PCR (qPCR), ist eine quantitative Methode, welche in Echtzeit (real time) eine Mengenbestimmung der DNA ermöglicht. Dafür wurde in dieser Arbeit SYBR Green I benutzt, ein interkalierender Farbstoff, der sich in die doppelsträngige DNA einlagert. Es entstehen DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplexe, deren Fluoreszenz am Ende jedes Zyklus gemessen wird und direkt proportional zur Anzahl der DNA-Doppelstränge ist. Entscheidend dabei ist der Schwellenwert, bei dem sich die Fluoreszenz erstmals deutlich vom Hintergrundsignal abhebt. Die Zyklusnummer, bei der dies zutrifft, wird als Crossing Point (CP) bezeichnet. Es wurden nur CP-Werte bis 35 analysiert, da bei länger andauernder Amplifikation falsch positive Ergebnisse häufig sind. Als Housekeeping Gen wurde 18S ribosomale RNA (rRNA) verwendet, das in allen Proben gleichermaßen enthalten ist. Damit kann es als endogenes Referenzgen zur relativen Quantifizierung herangezogen werden.

Die PCR durchläuft 40 Zyklen, an deren Ende eine Schmelzkurvenanalyse stattfindet. Diese dient zur Produktidentifikation. Dabei wurde die Temperatur in kleinen Schritten erhöht und das Fluoreszenzsignal schrittweise gemessen. Wenn die in der PCR hergestellten DNA-Doppelstränge denaturieren, nimmt das Fluoreszenzsignal ab. Der Zeitpunkt ist dabei von der Länge und Sequenz des Amplifikats abhängig. Dadurch kann mithilfe des Schmelzpunktes auf das DNA-Fragment zurückgeschlossen werden. Mehr als ein Schmelzpunkt suggeriert, dass auch andere Produkte wie Primerbindungen (primer dimers) amplifiziert wurden. Die Probe wurde dann von der Analyse ausgeschlossen.

Zur Durchführung der rt PCR wurde der Lightcycler 480 von Roche verwendet. Die wie oben beschrieben hergestellten cDNA RT+ und RT- wurden mit Aqua ad iniectabilia (Braun) 1:10 verdünnt. 8.6 µl der verdünnten cDNA RT+ oder RT- wurden in ein well der 96 well Platte gegeben. Der Mastermix wurde wie in Tabelle 9 dargestellt zusammengemischt. 11.4 µl Mastermix wurden in jedes well zur cDNA gegeben. Als Negativkontrolle wurde anstelle von cDNA destilliertes Wasser verwendet. Die 96 well Platte wurde mit Abdeckfolie versiegelt und bei 4°C und 280 g für 2 Minuten zentrifugiert.

Die rt PCR wurde im Lightcycler 480 (Roche) mit der Vorlage SYBR Green I 96-I mit den in Tabelle 10 gezeigten Einstellungen durchgeführt.

Tabelle 9: Zusammensetzung des Mastermix für die rt PCR.

Bestandteile	Volumen (µl)
Primer Forward	0,6
Primer Reverse	0,6
Syber Green	10
Taq Polymerase	0,16

Die Zusammensetzung des Mastermix erfolgte mit den hier angegebenen Volumina. Vor Zugabe der Taq-Polymerase wurde die Mischung gevortext. Das Gesamtvolumen betrug 11.4 µl. Je nach Anzahl der benötigten wells wurde ein Vielfaches des Mastermix zusammengemischt, von dem jeweils 11,4 µl pro well benutzt werden.

Tabelle 10: Einstellungen des Lightcycler 480 bei der Durchführung der real-time PCR

	Dauer	Temperatur (°C)	
Preinkubation	5 min	95	
Denaturierung	10 sec	95	
Annealing	10 sec	60	40 Wiederholungen
Amplifikation	10 sec	72	
Schmelzkurve	5 sec	95	
kontinuierlicher Anstieg von 65 auf 97°C			

Verwendet wurde das SYBR Green I 96-I Protokoll. Während der Preinkubation wurde für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Denaturierung, Annealing und Amplifikation wurden insgesamt 40 Mal wiederholt. Dafür erhitzte der Lightcycler für 10 Sekunden auf 95°C, dann für 10 Sekunden auf 60°C und für weitere 10 Sekunden auf 72°C bevor erneut die Denaturierung beginnt. Nach Abschluss der 40 Zyklen wird die Schmelzkurve hergestellt, indem die Temperatur schrittweise von 65°C auf 95°C erhöht wird.

Nach Abschluss der PCR erhält man für jedes well einen Crossing Point und einen Melting Point. Die Melting Points wurden zur Kontrolle verwendet, die Crossing Points zur Berechnung der Genexpression. Die Genexpression jeder Probe wurde nach folgender Formel auf das Housekeeping Gen 18S normalisiert (Formel 1):

Formel 1: Normalisierung der Genexpression mit dem Housekeeping-Gen 18S

$$\text{Genexpression} = 2^{(\text{CP}[18\text{S}]-\text{CP}[\text{Zielgen}])}$$

2.4. Histopathologische Methoden

2.4.1. Färbungen

Anfertigung der Paraffinschnitte

Die Mittelstücke der Nieren, welche zur Fixierung 24 Stunden in 4% Formalinlösung gelagert wurden, wurden anschließend in Paraffin eingelegt und 2µm dicke Schnitte wurden angefertigt. Die Schnitte wurden auf Superfrost ultra plus Objektträger aufgetragen und für 12 Stunden im Trockenschrank bei 37°C inkubiert. Entparaffinisierung wurde durchgeführt, indem die Schnitte wie folgt in Xylol und folgenden Alkohole inkubiert wurden: Xylol (3 * 5 Minuten), 100%iger Ethanol (3 * 3 Minuten) und 95%iger Ethanol (2 * 3 Minuten).

Perjodsäure Schiff Färbung

Die wie oben beschrieben angefertigten Schnitte wurden in 70%igem Ethanol (1 * 3 Minuten) inkubiert und anschließend für 2 * 5 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen. Dann wurden die Proben für 5 Minuten in Perjodsäure Lösung (2% in destilliertem Wasser) inkubiert und darauffolgend für 5 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen. Als nächstes wurden die Schnitte für 20 Minuten bei Raumtemperatur in Schiff-Reagenz getaucht und nachfolgend mit Leitungswasser für 7 Minuten gewaschen und mit Hämatoxylin Lösung für 2 Minuten gegengefärbt. Erneut wurde für 5 Minuten mit Leitungswasser gewaschen und zuletzt wurden die Schnitte in eine aufsteigende Alkoholreihe, dann Xylol und einen Tropfen Mounting Medium getaucht, getrocknet und mit einem Deckglas versehen.

Immunhistochemische Färbungen

Die wie oben beschrieben angefertigten Paraffinschnitte wurden mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen (2*5 Minuten) und 20 Minuten im Dunkeln in einer Lösung aus H₂O₂ und Methanol (20 ml 30%iges H₂O₂ in 180 ml Methanol) zur Blockade der endogenen Peroxidase inkubiert und anschließend zwei Mal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Zur Demaskierung wurden sie in aufgekochte Antigendemaskierungslösung (3 ml Antigendemaskierungslösung + 300 ml destilliertes Wasser) getaucht und für 20 Minuten im Autoklav bei 1 bar autoklaviert. Die Schnitte wurden für 40 Minuten bei Raumtemperatur gekühlt und mit PBS gewaschen. Zur endogenen Biotin Blockade wurden sie 15 Minuten mit einem Tropfen Avidin (Vektor) inkubiert gefolgt von einer Inkubation mit Biotin (Vector) für weitere 15 Minuten. Im Anschluss wurden die Schnitte zweimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen.

Die Schnitte wurden entweder für 1 Stunde bei Raumtemperatur (*Lotus tetragonolobus Lectin*) oder bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer (Ratten anti-Maus Ly-6B.2) inkubiert, gefolgt von zwei fünfminütigen Waschgängen mit PBS. Anschließend wurden die Schnitte mit biotinilierten sekundären Antikörpern (1:300, verdünnt mit PBS) für 30 Minuten inkubiert und danach erneut zweimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Substratlösung (ABC Lösung, Vektor) wurde hinzugefügt und die Schnitte wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert und nachfolgend für 5 Minuten mit

PBS und dann Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) gewaschen. Als nächstes wurden die Schnitte mit 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) gefärbt und mit Methylgrün (Fluka) gegengefärbt, mit aufsteigender Alkoholreihe von 96% gewaschen, um überschüssiges Xylen zu entfernen, und letztendlich mit VectaMount (Vektor) befestigt.

2.4.2. Histopathologische Evaluation der Tubulusschädigung

Die PAS-Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop mit 100facher Vergrößerung untersucht. Mittels eines semiquantitativen Beurteilungs-Systems wurde das Ausmaß des Schadens beurteilt. Dafür wurden jeweils 15 Blickfelder im äußeren Streifen der äußeren Medulla (OSOM) begutachtet (s. Abbildung 1). Dort liegen die S3-Segmente des proximalen Tubulus, in denen der größte Schaden zu erwarten ist. Bekannte Merkmale der akuten Tubulusschädigung sind: Nekrose der Tubuluszellen, Dilatation der Tubuli, Abflachung des Epithels, Abschilferung von Tubuluszellen, Verlust des Bürstensaums, Bildung von Proteinzyclindern [104]–[106]. In dieser Arbeit wurde abgeschätzt, welcher prozentuale Anteil aller Tubuli im OSOM nekrotisch ist. Die Untersucher waren bezüglich der Gruppenzugehörigkeit verblindet und die Proben wurden stichprobenartig von mehreren Untersuchern begutachtet.

2.4.3. Kolorimetrische Analysen der immunhistochemischen Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen wurden unter 50facher Vergrößerung abfotografiert und mit Image J ausgewertet. Dafür wurde das Plugin Semiautomatic Limited Area Black Fraction benutzt. Der OSOM wurde ausgeschnitten und die Schwelle der kolorimetrischen Messung auf 70 eingestellt. So konnte der prozentuale Anteil der schwarz angefärbten Strukturen spezifisch gemessen werden.

2.5. Statistische Analysen

Berechnet und graphisch dargestellt wurden die Mittelwerte mit dem *standard error of the mean* (SEM), der als Fehlerbalken angezeigt wird. Zum Vergleich einzelner Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test benutzt, da bei einer Gruppengröße von $n=5$ nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden kann. Als statistisch signifikant definiert und so auch im Text verwendet wurde ein p -Wert kleiner 0.05. Durch Sterne markiert sind drei Abstufungen der statistischen Überprüfungen auf das Vorliegen eines signifikanten Unterschieds (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

3. Ergebnisse

3.1. Temperaturkontrolle

3.1.1. Fehlende Temperaturkonstanz beim bisherigen Versuchsaufbau

Die ischämische Reperfusion lässt sich in vier Phasen unterteilen, die präoperative Phase nach Narkoseinduktion bis zum Erreichen der chirurgischen Toleranz, die Schnittphase, in der das Abklemmen der Niere erfolgt, die Ischämiezeit und die Nahtphase, in der die Reperfusion induziert wird und die Mäuse zugenäht werden. Um die Temperatur der Mäuse während der IR zu untersuchen, wurde die Körperkerntemperatur der Mäuse wie im Methodenkapitel beschrieben gemessen. Dabei wurde zunächst erfasst, wie der Temperaturverlauf der Mäuse unter dem bisher benutzten Versuchsaufbau war (s. Abbildung 5). Bislang wurden die Mäuse präoperativ unter einer Wärmelampe und während der Ischämiezeit auf einer Wärmeplatte unter einer Wärmelampe gelagert. Ziel war es, die Körperkerntemperatur der Mäuse im vorab definierten Zielbereich bei $37.5 \pm 1^\circ\text{C}$ zu halten und Schwankungen der Temperatur möglichst zu vermeiden. $0.69 \pm 1.1\%$ der gemessenen Werte lagen mit dem ursprünglichen Versuchsaufbau im Rahmen zwischen 36.5°C und 38.5°C . Alle anderen Werte lagen darunter. Die Ischämiezeit war die einzige Phase, in der die Temperaturen der Mäuse stiegen, im Schnitt um $0.1^\circ\text{C}/\text{min}$ und damit um 4°C über 45 Minuten auf 35.9°C (s. Tabelle 11). Am ausgeprägtesten waren die Temperaturänderungen während der Schnitt- und Nahtphasen. Dort fiel die Temperatur der Mäuse um $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ und damit um mehr als 2°C in fünf Minuten. Am Ende der Schnittphase erreichten die Mäuse dann im Mittel 32°C . Auch während der präoperativen Phase fiel die Temperatur der Mäuse mit einer Geschwindigkeit von $0.2^\circ\text{C}/\text{min}$. Die kompletten Werte sind in Tabelle 11 zu finden.

Tabelle 11: Gemessene Werte mit dem bisher benutzten Versuchsaufbau.

Phase	Temperaturänderung ($^\circ\text{C}/\text{min}$) \pm SD	Dauer des Abschnitts (min)	Eingangstemperatur ($^\circ\text{C}$) \pm SD	Änderung über die Dauer des Abschnitts ($^\circ\text{C}$) \pm SD
Präoperativ	$-0,19 \pm 0,1$	7,5	$35,1 \pm 0,7$	$-1,0 \pm 0,5$
Schnitt	$-0,50 \pm 0,1$	5,0	$34,2 \pm 0,4$	$-2,3 \pm 0,5$
Ischämiezeit	$0,10 \pm 0,0$	45,0	$32,0 \pm 0,8$	$4,0 \pm 0,7$
Naht	$-0,48 \pm 0,1$	5,0	$35,9 \pm 0,4$	$-2,0 \pm 0,5$
Ende			$34,1 \pm 0,8$	

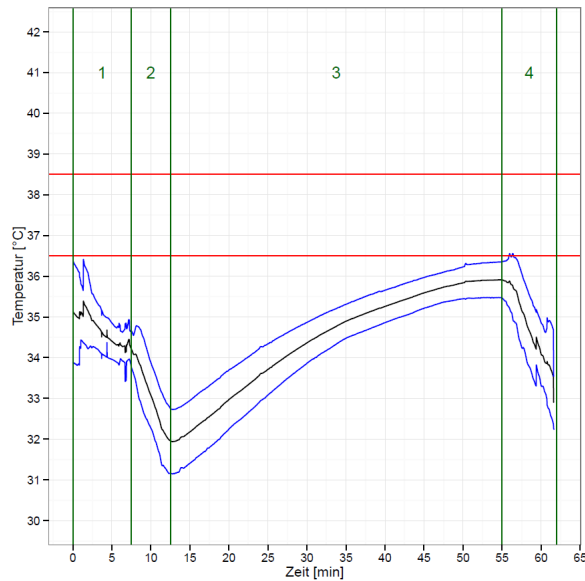


Abbildung 5: Temperaturverlauf (1): Dargestellt sind die Körperkerntemperaturen der Mäuse als Mittelwert mit Standardabweichung mit dem bisher etablierten Versuchsaufbau. 1: Präoperative Phase; 2: Schnittphase; 3: Ischämiezeit; 4: Nahtphase. Schon zu Beginn der Messung ist die Temperatur der Mäuse unter die Körperkerntemperatur von 37.5°C gesunken. Während der Schnitt- und Nahtphase ist der Abfall der Temperatur am ausgeprägtesten. Der mit roten Strichen markierte Zielbereich zwischen 36.5°C und 38.5°C wurde lediglich zum Ende der Ischämiezeit teilweise erreicht. n=5, männlich

Aus den oben beschriebenen Ergebnissen geht hervor, dass die Temperaturen der Mäuse die meiste Zeit unterhalb des festgelegten Zielbereichs und damit zu niedrig waren und eine Temperaturkonstanz nicht erreicht wurde. Um die Maustemperatur im Zielbereich zwischen 36.5°C und 38.5°C zu halten, ist es daher zum einen notwendig, die Wärmezufuhr besonders während der Schnitt- und Nahtphase zu erhöhen, zum anderen sicherzustellen, dass die Mäuse nicht zu warm werden. Dabei sollte eine möglichst geringe Schwankungsbreite der Maustemperatur und eine einfache Handhabung des Versuches erreicht werden, um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse auch zwischen verschiedenen Untersuchern zu erzielen.

3.1.2. Materialuntersuchungen

Um die Temperatur möglichst konstant und die Streuung gering zu halten, musste sichergestellt werden, dass die benutzten Geräte sowohl über einen bestimmten Zeitraum, als auch über die ganze Fläche des benutzten Gerätes konstant die gleiche Temperatur

halten können. Benutzt wurden insgesamt zwei verschiedene Wärmeplatten, eine Wärmekammer und eine Wärmelampe. Die gemessenen Temperaturen der Wärmeplatte 1, die im finalen Versuchsaufbau Verwendung findet, ist in Abbildung 6 als Verteilung über Raum und Zeit dargestellt. Selbiges ist für die Wärmekammer in Abbildung 7 dargestellt. Um die Temperatur der Wärmekammer konstant zu halten, war es notwendig, diese mit Aluminiumfolie auszukleiden, um durch Reflexion geringere räumliche Schwankungen zu erreichen. Zur Verbesserung des Wohlergehens der Tiere wurde die Wärmekammer mit Streu ausgelegt. Die Wärmeplatte und besonders die Wärmekammer zeigen eine gute zeitliche und räumliche Konstanz. Somit kann davon ausgegangen werden, dass Schwankungen der Maustemperatur nicht durch größere Schwankungen der Geräte verursacht werden.

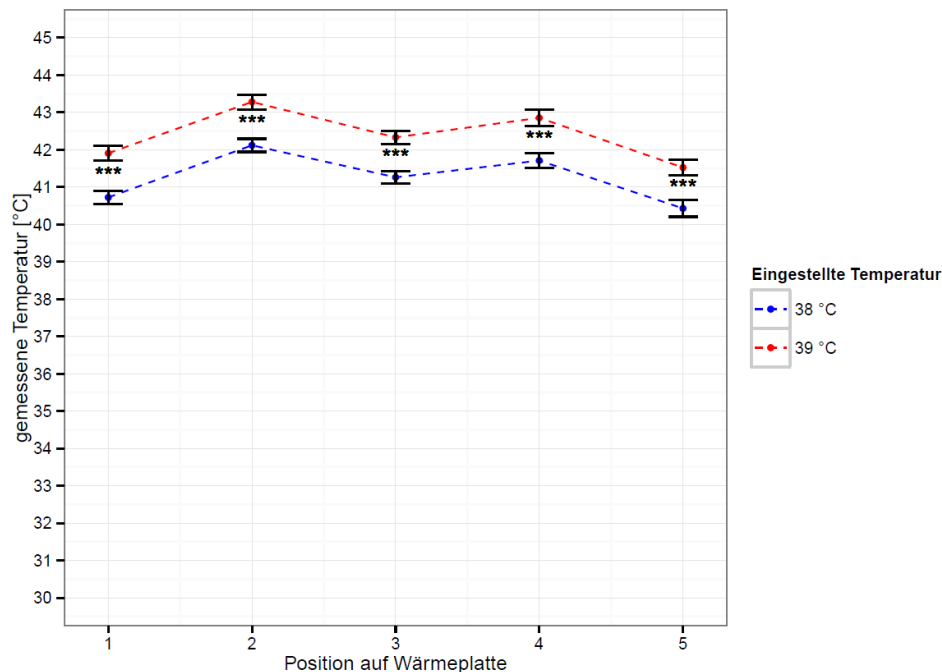


Abbildung 6: Temperatur der Wärmeplatte 1 über Zeit und Raum. Dabei ist die räumliche Verteilung durch die Positionen auf der Wärmeplatte dargestellt, die zeitliche durch die Standardabweichungsbalken. Gemessen wurde über einen Zeitraum von mindestens 30 Minuten. 5 Temperatursonden wurden auf der Wärmeplatte in gleichen Abständen befestigt, die alle gleichzeitig die Temperatur gemessen haben. Die rote Kurve zeigt die gemessenen Temperaturen bei einer Temperatureinstellung des Gerätes von 39°C, die blaue bei 38°C. Die Temperatur der Wärmeplatte ist deutlich höher als der eingestellte Wert, da die Temperatureinstellung der Wärmeplatte durch eine unter der Wärmeplatte befestigte Sonde reguliert wird. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standard error of the mean (SEM). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. eingestellte Temperatur 38°C.

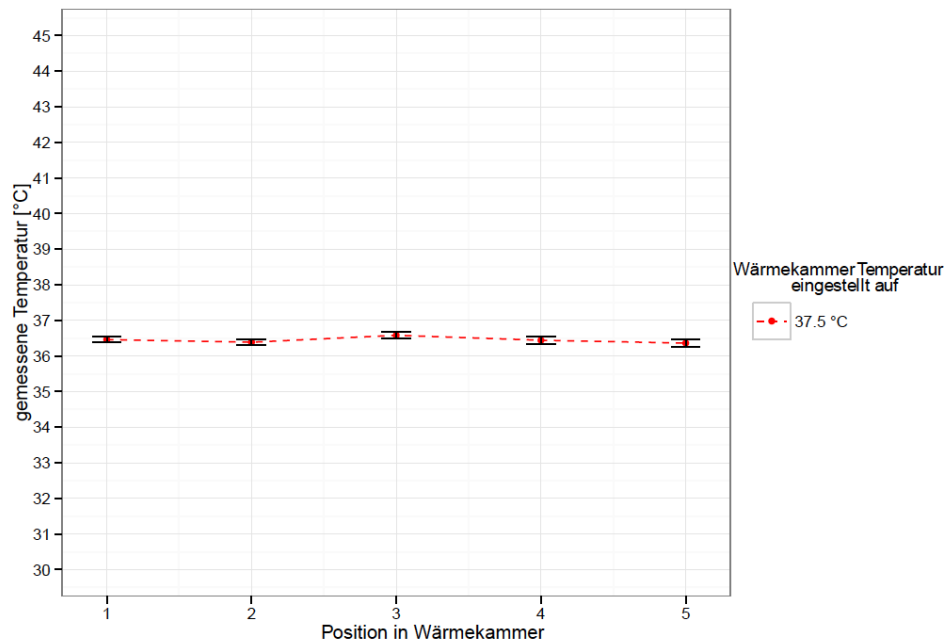


Abbildung 7: Temperatur der Wärmekammer über Zeit und Raum. Dabei ist die räumliche Verteilung durch die Positionen in der Wärmekammer dargestellt, die zeitliche durch die Standardabweichungsbalken. Gemessen wurde über mindestens 30 Minuten. Die Temperatursonde wurde über den Lüftungsschacht eingeführt, um Wärmeverluste durch dauerhaftes Offenhalten der Klappe durch die Sondenkabel zu verhindern. Nach mindestens 30 Minuten wurde die Sonde verrückt, sodass 5 Positionen in gleicher Entfernung voneinander gemessen wurden. Es zeigt sich eine sehr gute Temperaturkonstanz sowohl über die Zeit, als auch im Raum.

Die im bisher benutzten Versuchsaufbau verwendete Wärmeplatte 2 wird im finalen Versuchsaufbau aus Handhabungsgründen nicht weiter verwendet, wurde allerdings sowohl im ursprünglichen Versuchsaufbau, als auch in den Versuchen mit Mäusen in Narkose verwendet. In Kombination mit einer Wärmelampe wurde diese Wärmeplatte im ursprünglichen Versuchsaufbau während der Ischämiezeit verwendet. Dabei erreichten die Mäuse gegen Ende der Ischämiezeit zu hohe Temperaturen, sodass sie auch dort keine Verwendung mehr findet. Dies wird im Kapitel 3.1.3 näher besprochen. Da die Wärmeplatte in den folgenden Versuchen noch Verwendung findet, ist die räumliche und zeitliche Verteilung der Temperatur mit und ohne Wärmelampe in Abbildung 8 dargestellt.

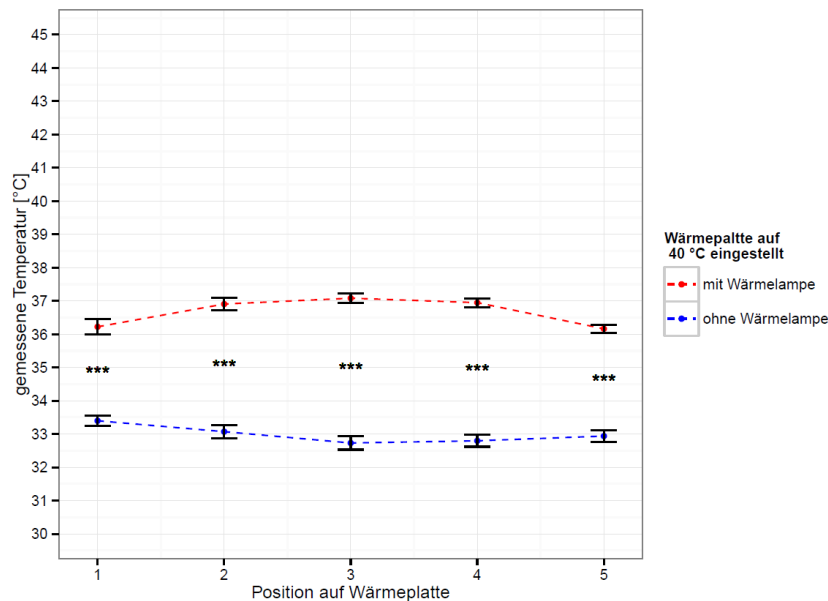


Abbildung 8: Temperatur der Wärmepalatte 2 über Zeit und Raum. Dabei ist die räumliche Verteilung durch die Positionen auf der Wärmepalatte dargestellt, die zeitliche durch die Standardabweichungsbalken. Die rote Kurve zeigt die gemessenen Temperaturen mit zusätzlicher Wärmelampe, die blaue ohne. Gemessen wurde über einen Zeitraum von mindestens 30 Minuten. 5 Temperatursonden wurden auf der Wärmepalatte in gleichen Abständen befestigt, die alle gleichzeitig die Temperatur gemessen haben. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. ohne Wärmelampe.

3.1.3. Verbesserte Temperaturstabilität in Narkose

Um die Wirkung verschiedener Geräte auf die Temperatur der Mäuse zu untersuchen, wurden zuerst Mäuse in Narkose gelegt und das IR-Modell ohne tatsächliche Operation, wie im Methoden-Kapitel beschrieben, nachgestellt. Dadurch konnte die Anzahl der für die Versuche benötigten Tiere reduziert werden. Schritt für Schritt wurden Änderungen am bisher etablierten Protokoll vorgenommen mit dem Ziel, am Ende die Temperaturen der Mäuse so konstant wie möglich bei 37.5°C zu halten. In den vier Phasen der IR wurden dabei verschiedene Geräte zur Wärmezufuhr verwendet, die in ihren Einstellungen und in ihrer Verwendung optimiert wurden. Eine Zusammenfassung der verwendeten Geräte und Einstellungen ist in Tabelle 12 zu finden.

Tabelle 12: Mäuse in Narkose: Versuchsaufbau bezogen auf die Wärmeversorgung in den vier Phasen der IR.

Nr.	Präoperativ	Schnitt	Ischämiezeit	Naht
0	Wärmelampe		Wärmeplatte 33°C und Wärmelampe	
1	Wärmelampe	Wärmeplatte 33°C	Wärmeplatte 33°C und Wärmelampe	Wärmeplatte 33°C
2	Wärmelampe	Wärmeplatte 36°C	Wärmeplatte 33°C und Wärmelampe	Wärmeplatte 36°C
3	Wärmekammer 37.3°C	Wärmeplatte 41°C	Wärmeplatte 40°C und Wärmelampe	Wärmeplatte 41°C
4	Wärmekammer 37.5°C	Wärmeplatte 41°C	Wärmekammer 39.2°C	Wärmeplatte 41°C

Erstgenannt ist das bisher etablierte Modell (Nr. 0), es folgen die weiteren wie im Fließtext unten beschriebenen Versuche. Von Versuch zu Versuch wurden jeweils schrittweise Änderungen vorgenommen. Gradangaben der Wärmekammer sind die eingestellten Werte, die der Wärmeplatte die gemessenen. Die Mäuse wurden während der verschiedenen Phasen (präoperativ, Schnitt, Ischämiezeit und Naht) wie in der Tabelle beschrieben durch Lagerung auf oder in den verschiedenen Geräten mit Wärme versorgt.

Wie oben beschrieben, war der beobachtete Temperaturabfall pro Minute am stärksten während der Schnitt- und Nahtphase. Daher wurde als erster Schritt eine Wärmeplatte für diese beiden Phasen eingeführt. Die Temperatur der Wärmeplatte wurde analog zur bisher benutzten Temperatur während der Ischämiezeit eingestellt und betrug gemessene 33°C (s. Versuch Nr. 1 Tabelle 12). Diese Maßnahme zeigte keinen sichtbaren Effekt. 0.2% der gemessenen Körperkerntemperaturen lagen im Zielbereich zwischen 36.5°C und 38.5°C. Daraufhin wurde bei der nächsten Messung die Temperatur der Wärmeplatte auf 36°C erhöht. Dies führte zu einem deutlicheren Effekt, jetzt lagen 39.7% der Werte im Zielbereich. Der Temperaturabfall während der Schnitt- und Nahtphase konnte von $-0.42 \pm 0.12^\circ\text{C}/\text{min}$ auf $-0.14 \pm 0.08^\circ\text{C}/\text{min}$ gesenkt werden. Weiterhin lässt sich beobachten, dass vor Beginn der Schnittphase die Temperatur der Maus abfällt. Obwohl dieselbe Maus wie in Versuch Nr. 1 verwendet und beide Male auf gleiche Weise im Käfig unter der Wärmelampe gelagert wurde, unterscheidet sich die Temperatur der Maus zu Beginn der Schnittphase um mehr als 1°C, was eine große Schwankung darstellt. Die Temperaturkurven beider Messungen sind exemplarisch in Abbildung 10 dargestellt.

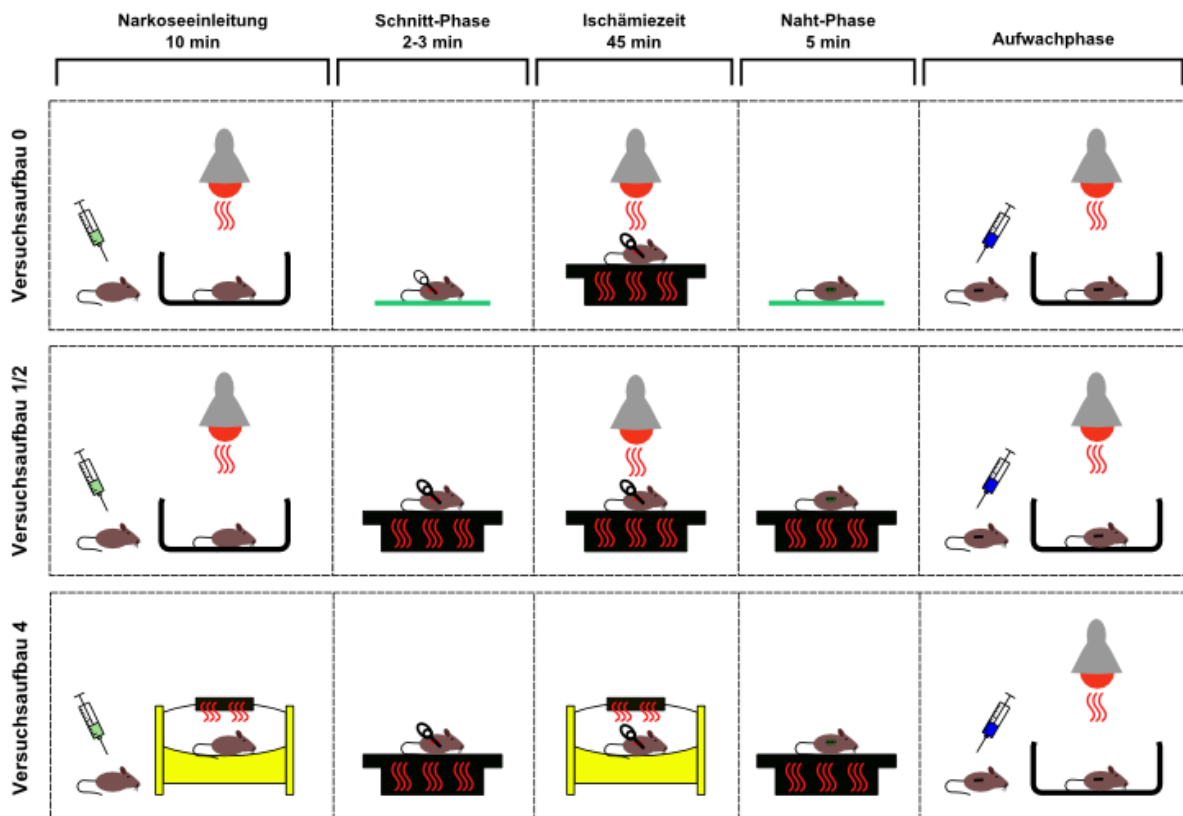


Abbildung 9: Versuchsaufbau mit Darstellung der Wärmezufuhr in den verschiedenen Phasen der IR: Dargestellt sind exemplarisch drei Versuchsaufbauten zur Übersicht: Versuch Nr. 0, 1 bzw. 2 und 4 aus Tabelle 12. Je nach Versuchsaufbau wurde Wärme durch bestimmte Geräte in den verschiedenen Phasen hinzugefügt, während der Narkoseeinleitung entweder über eine Wärmelampe (Versuchsaufbau 0 und 1/2) oder durch die Wärmekammer (Versuchsaufbau 4), während der Schnitt- und Nahtphase entweder keine Wärmezufuhr (Versuchsaufbau 0) oder durch eine Wärmeplatte (Versuchsaufbau 1/2 und 4) und während der Ischämiezeit entweder durch eine Wärmeplatte und Wärmelampe (Versuchsaufbau 0 und 1/2) oder durch die Wärmekammer (Versuchsaufbau 4). Zur Aufwachphase wurden die Mäuse in allen Gruppen antagonisiert und unter einer Wärmelampe gelagert.

Um die Temperatureinstellung der Wärmeplatte zu finden, bei der sich die Temperatur der Mäuse konstant bei 37.5°C hält, wurden die Mäuse mittels gleichzeitiger Temperaturmessung und Adaptation der Geräteeinstellungen auf 37.5°C gebracht und dann auf einer Wärmeplatte gelagert. Dabei wurde davon ausgegangen, dass eine Maustemperatur über oder unter 37.5°C zur Einstellung der Wärmeplattentemperatur ungeeignet ist, da die Temperaturen der Mäuse erst fallen bzw. steigen würden, bevor sie bei 37.5°C konstant blieben. Die Messungen ergaben, dass mit der bei uns verwendeten Wärmeplatte 2 eine Temperatur von gemessenen 41°C auf der Wärmeplatte die Mäuse mit genügend Wärme versorgt, um die Temperatur der Mäuse in Narkose zwischen 36.5 °C und 38.5°C zu halten. Für die Ischämiezeit wurde Wärmeplatte 2 zusammen mit einer

Wärmelampe getestet. Dort zeigte sich, dass mit gemessenen 40°C auf der Wärmeplatte und einem Abstand der Wärmelampe zur Wärmeplatte von 53 cm die Temperatur der Mäuse in Narkose konstant im Zielbereich blieb.

In den oben beschriebenen Messungen war die Temperatur der Maus in Versuch Nr. 1 und Nr. 2 mit $33.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ schon vor Beginn der Schnittphase zu gering. Daher wurde als nächstes die präoperative Phase optimiert, um ein Abfallen der Körperkerntemperatur der Mäuse von Beginn an zu verhindern. Zuerst wurde getestet, ob es möglich ist, die Temperatur der Mäuse mithilfe der Wärmekammer bei 37.5°C zu halten. Dies konnte erreicht werden, indem die Wärmekammer auf 37.3°C eingestellt wurde und die Mäuse direkt nach Narkoseinjektion dort gelagert wurden. Eine vergleichende Darstellung der Maustemperaturen in der Wärmekammer und wie vorher üblich im Käfig unter der Wärmelampe ist in Abbildung 11 gezeigt.

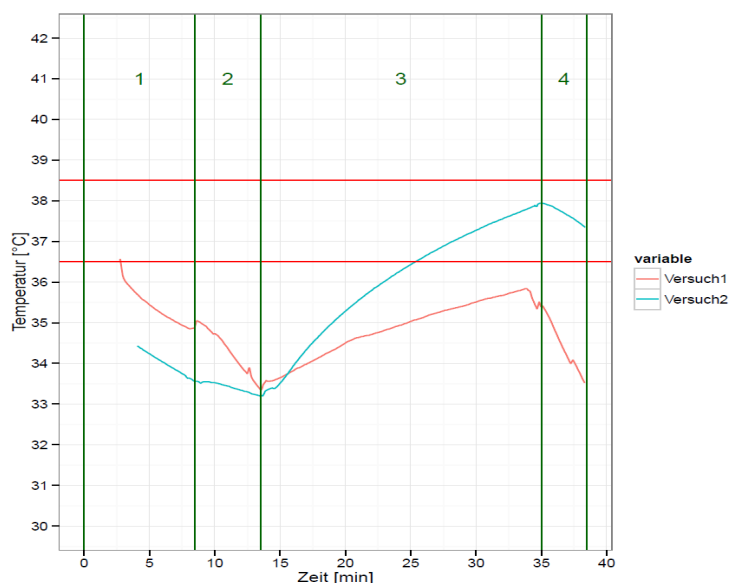


Abbildung 10: Vergleich der Maus aus Versuch 1 und 2: Beide Male wurde die gleiche Maus in Narkose verwendet. In Versuch 1 war Wärmeplatte 2, die während der Schnitt- und Nahtphase verwendet wurde, auf 40°C eingestellt (gemessene 33°C), in Versuch 2 auf 43°C (gemessene 36°C). Es zeigt sich ein geringerer Temperaturabfall während der Schnitt- und Nahtphase in Versuch 2 im Vergleich zu Versuch 1. Auch ist der Temperaturanstieg während der Ischämiezeit deutlich ausgeprägter. Die roten Linien begrenzen den Zielbereich zwischen 36.5°C und 38.5°C . In Versuch 2 liegen 39.7% der gemessenen Körperkerntemperaturwerte der Maus in diesem Zielbereich. Der Zeitpunkt 0 Minuten ist der Beginn der Narkose. Erst 2 bis 3 Minuten nach Narkoseinduktion beginnt die Messung. Die Temperatur der Maus ist dabei beide Male abgefallen, allerdings unterschiedlich stark, was auf die Variabilität der Methodik, also der Lagerung der narkotisierten Maus unter einer Wärmelampe im Käfig hinweist.

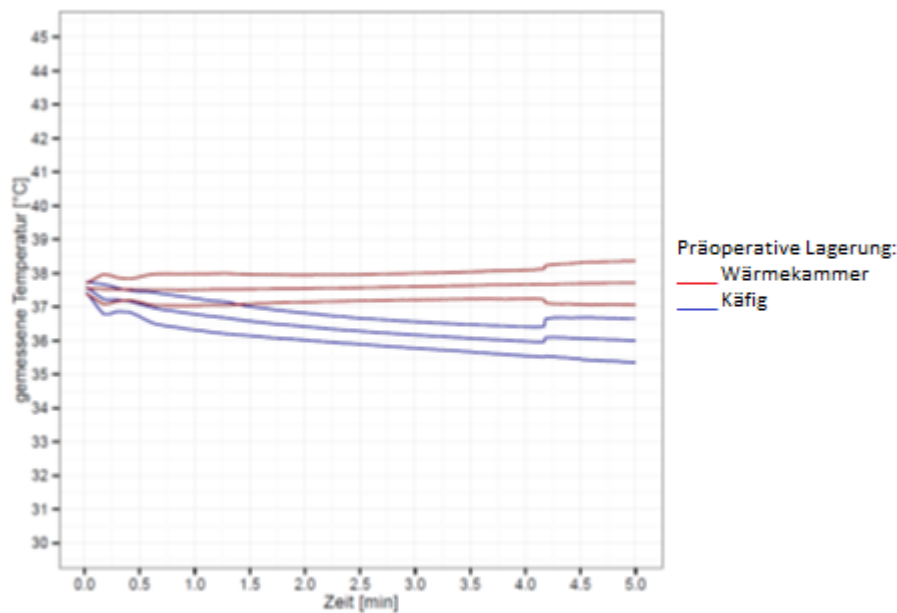


Abbildung 11: Vergleichende Darstellung der Maustemperaturen in der Wärmekammer und im Käfig unter der Wärmelampe. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. Es kann ein Temperaturabfall während der Zeit im Käfig unter der Wärmelampe beobachtet werden. Die Mäuse, die direkt nach Narkoseinjektion in die Wärmekammer gelegt wurden, hatten dabei konstante Temperaturen um 37.5°C. Dabei zeigte sich weder ein Temperaturanstieg noch ein Temperaturabfall während der Zeit in der Wärmekammer; die Temperatur konnte konstant gehalten werden. n=3

Damit alle Mäuse vor Beginn der operativen Phase möglichst eine Temperatur von 37.5°C erreichen, wurde auch die Zeit in der Wärmekammer standardisiert. Nach 10 Minuten in der Wärmekammer erreichten die Mäuse unabhängig von ihrer Ausgangstemperatur 37.5°C, die Maustemperaturen stiegen nicht weiter an, ein Plateau war erreicht. Ein einheitlicher Ausgangspunkt vor Operationsbeginn war ein wichtiger Schritt, um die Temperatur aller Mäuse mit wenig Variabilität konstant zu halten.

Die in obigen Versuchen gefundenen Einstellungen der Wärmekammer und der Wärmeplatte, die die Mäuse konstant bei 37.5°C halten können, wurden im nächsten Versuch benutzt, um eine komplette IR nachzustellen. Dabei war der Versuchsaufbau wie in Tabelle 12 Nr. 3 aufgezeigt. In Abbildung 12 ist die Temperaturkurve als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. $47.8 \pm 3.6\%$ der Werte lagen im Zielbereich. Allerdings waren die Werte außerhalb des Zielbereichs diesmal nicht unter 36.5°C, sondern über 38.5°C.

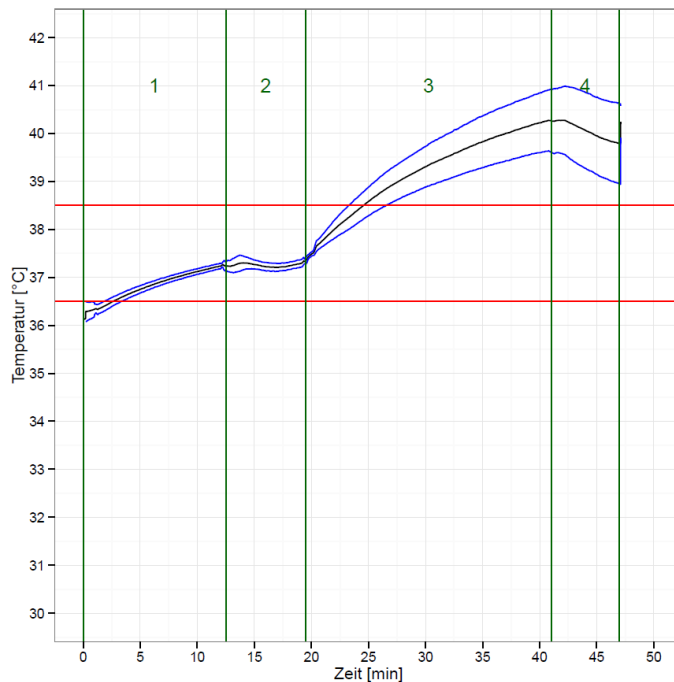


Abbildung 12: Temperaturverlauf (3): Mäuse wurden wie in Tabelle 12 Nr. 3 aufgezeigt gelagert. Die präoperative Phase wurde auf 10 Minuten standardisiert, am Ende dieser Zeit erreichen bzw. haben die Mäuse eine Körperkerntemperatur von 37.5°C mit einer geringen Streuung der Temperatur. Mit Beginn der Ischämiezeit, während der sich die Mäuse auf der Wärmeplatte unter der Wärmelampe befinden, nimmt die Streuung um den Mittelwert stark zu und die Maustemperatur wird variabler. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. 1: Präoperative Phase; 2: Schnittphase; 3: Ischämiezeit; 4: Naht Phase. n=3

In der Abbildung zeigt sich außerdem, dass die Streuung um den Mittelwert während der präoperativen Phase in der Wärmekammer und während der Schnittphase auf der Wärmeplatte sehr gering ist, mit zunehmender Zeit auf der Wärmeplatte unter der Wärmelampe aber zunimmt. Obwohl in vorherigen Messungen mit gleicher Einstellung der Wärmeplatte und der Wärmelampe zur Ischämiezeit die Temperaturen der Mäuse konstant im Zielbereich lagen, zeigte sich in dieser Messung ein deutlicher Anstieg der Temperaturen. Dies könnte sich durch die Anfälligkeit der Methode erklären lassen. So könnten Änderungen der Raumtemperatur, die z.B. durch ein geöffnetes Fenster herrühren, oder jahreszeitliche Unterschiede solche Effekte haben.

Daher wurde als nächster Schritt die Wärmekammer auch in der Ischämiezeit eingeführt. In der Wärmekammer sind die Mäuse besser vor äußeren Einflüssen geschützt und sollten daher stabilere und weniger variable Temperaturverläufe haben. Die Messungen ergaben allerdings, bei gleicher Einstellung der Wärmekammer für die präoperative Phase und die

Ischämiezeit, niedrigere Temperaturen der Mäuse in Narkose während der simulierten Ischämiezeit als während der präoperativen Phase. Hochstellen der Wärmekammer-temperatur bis auf 39.2°C war nötig, um die Mäuse bei 37.5°C zu halten. Da der offensichtlichste Unterschied zwischen den Mäusen in Narkose vor und nach der imitierten Schnittphase eine feuchte Kompresse auf der Flanke ist, könnte diese ursächlich gewesen sein. Es wurde folglich auch die Menge an Natriumchloridlösung (NaCl), die auf die Kompresse gegeben wurde auf 300 µl standardisiert, um so eine weitere Variable auszuschalten. Mit dieser Menge konnte erreicht werden, dass die Flanke der Maus durch die ganze Ischämiezeit befeuchtet bleibt, die Maus aber nicht in NaCl getränkt ist und so unnötig größere Temperaturverluste erleidet.

Um die Temperaturkontrolle während der Ischämiezeit zu optimieren, wurden die Mäuse wie im vorherigen Versuch erst in der Wärmekammer und zur Schnitt- und Nahtphase auf der Wärmeplatte gelagert. Während der Ischämiezeit wurden die Mäuse nun in der Wärmekammer bei eingestellten 39.2°C gelagert (s. Tabelle 12 Nr. 4). Mit dieser Einstellung konnte in vorherigen Versuchen eine gute Temperaturkonstanz im Zielbereich erreicht werden. Die Temperaturkurven sind in Abbildung 13 zu sehen.

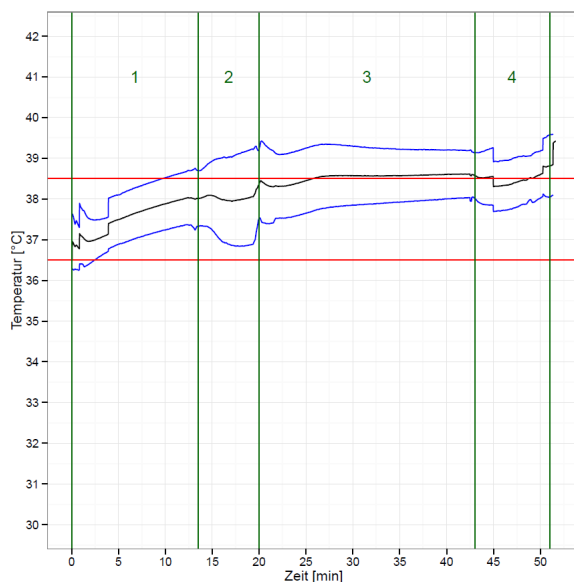


Abbildung 13: Temperaturverlauf (4): Mäuse wurden präoperativ in der Wärmekammer bei eingestellten 37.3°C gelagert, in der Schnitt- und Nahtphase auf einer 41°C warmen Wärmeplatte und in der Ischämiezeit in der Wärmekammer bei 39.2°C. Zwar zeigt sich, dass die Temperaturänderungen nur noch graduierlich sind und größere Schwankungen vermieden wurden, allerdings ist die Temperatur insgesamt zu hoch. $49.5 \pm 35.2\%$ der Werte lagen im durch die roten Linien markierten Zielbereich zwischen 36.5°C und 38.5°C. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. 1: Präoperative Phase; 2: Schnittphase; 3: Ischämiezeit; 4: Nahtphase. n=4 (2 männlich, 2 weiblich)

49.5 ± 35.2% der Werte lagen im Zielbereich. Die Temperaturänderungen waren gering. So stiegen die Temperaturen um 0.07°C/min während der präoperativen Phase, während der Schnittphase und der Ischämiezeit lag die Temperaturänderung bei 0.01°C/min. Obwohl noch immer die Hälfte der Werte nicht im Zielbereich lagen, konnte eine Verbesserung zum Ausgangswert erzielt werden. Die Verringerung der Temperaturveränderungen von 0.1°C/min bis -0.5°C/min im bisher etablierten Versuchsaufbau zu 0.01°C/min bis 0.07°C/min im zuletzt beschriebenen Versuch zeigt die verbesserte Temperaturstabilität. Auch lagen mit 49.5 ± 35.2% deutlich mehr Werte im Zielbereich als im etablierten Versuchsaufbau mit 0.69 ± 1.1%. Zur weiteren Optimierung der Temperaturkontrolle der Mäuse in Narkose sind erneute Versuche notwendig. Da das zu erreichende Ziel jedoch nicht die Temperaturkontrolle der Mäuse in Narkose, sondern während der IR war, wurden mit dieser Messung die Versuche in Narkose beendet. Die Versuche in Narkose waren gut dafür geeignet erste Verbesserungen der Temperaturkontrolle zu erreichen, die Feinabstimmung wurde am zu untersuchenden IR-Modell vorgenommen.

3.1.4. Stabile intraoperative Temperaturkurven

Nachdem in den vorausgehenden Kapiteln zuerst auf die Ausgangssituation eingegangen wurde und dann Verbesserungen der Temperaturkontrolle anhand von Mäusen in Narkose vorgenommen wurden, werden nun die Ergebnisse der Temperaturmessungen während der IR aufgezeigt. Bei der Generierung der Daten wurden die Ergebnisse der vorherigen Messungen als Ausgangswerte verwendet. Dabei zeigte sich, dass nicht nur die äußeren Bedingungen, sondern auch die Beschaffenheit der Mäuse selber einen Einfluss auf die Maustemperaturen hatte. Untersucht wurden 6.4 Wochen alte weibliche 19 ± 1 g schwere und 8.7 Wochen alte männliche 25 ± 1g schwere C57Bl/6N Mäuse, beides häufig genutzte Mauskollektive. Die leichteren weiblichen Mäuse wiesen unter den gleichen Bedingungen deutliche niedrigere Körperkerntemperaturen auf, brauchten also mehr Temperaturzufuhr, um die Körperkerntemperaturen konstant im Zielbereich zu halten. Daraufhin wurde der Versuchsaufbau für beide Gruppen separat standardisiert. Die benötigten Einstellungen sind in Tabelle 13 vergleichend dargestellt.

Tabelle 13: Temperatureinstellungen

Geschlecht, Alter (Wochen)	Gewicht (g)	präoperativ	Schnitt	Ischämiezeit	Naht
männlich, 8.7	25 ± 1	Wärmekammer 37°C	Wärmeplatte 37°C	Wärmekammer 37.8°C	Wärmeplatte 37°C
weiblich, 6.4	18 ± 1	Wärmekammer 37.3°C	Wärmeplatte 37°C	Wärmekammer 38.3°C	Wärmeplatte 37°C

Temperatureinstellungen, die bei C57Bl/6N Mäusen zur besten Temperaturkontrolle führten. Vergleichend dargestellt sind 25 ± 1 g schwere männliche und 18 ± 1 g schwere weibliche Mäuse. Die Einstellungen der verwendeten Geräte während der verschiedenen Phasen der IR sind dargestellt. Die leichteren, jüngeren weiblichen Mäuse brauchten eine höhere Wärmezufuhr, um eine Temperaturkonstanz im Zielbereich zu erreichen.

Im Vergleich zu Tabelle 12 wurde während der Schnitt- und Nahtphase Wärmeplatte 1 benutzt, da die Wärmeplatte 1 flacher ist und dies die Operation vereinfacht. Wärmeplatte 1 hat im Gegensatz zur alten Wärmeplatte eine raue Plastikoberfläche, Wärmeplatte 2 war mit Alufolie abgedeckt. Mit Wärmeplatte 1 waren niedrigere gemessene Temperaturen der Platte nötig, um die Temperatur der Mäuse bei 37.5°C zu halten, was sich eventuell durch eine bessere Wärmeüberleitung auf die Maus erklären könnte. Weiterhin wurde zur weiteren Standardisierung der Methodik und zur Minimierung der Feuchtigkeits- und Wärmeverluste die Niere nach intraperitoneal verlagert.

Die Temperaturkurven der männlichen Mäuse sind in Abbildung 14 dargestellt, die der weiblichen in Abbildung 15. Beide zeigen eine gute Temperaturkontrolle; $99.3 \pm 1.5\%$ der gemessenen Werte der männlichen Mäuse und $87.1 \pm 8.9\%$ der gemessenen Werte der weiblichen Mäuse lagen im Zielbereich zwischen 36.5°C und 38.5°C. Die Temperaturänderungen über die gesamte Dauer waren gering. Die Werte sind in Tabelle 14 dargestellt. So konnte über die 45 Minuten Ischämiezeit eine absolute Temperaturänderung von insgesamt $0.7 \pm 0.4^\circ\text{C}$ gemessen werden, vor Standardisierung der Methode waren es $4.0 \pm 0.7^\circ\text{C}$. Auch die Temperaturänderung pro Minute war mit dem neuen Versuchsaufbau nie größer als $0.1 \pm 0.05^\circ\text{C}$ im Vergleich zu bis zu $0.5 \pm 0.1^\circ\text{C}/\text{Minute}$ vor Standardisierung der Methode.

Tabelle 14: Gemessene Werte mit dem neu etablierten Versuchsaufbau.

Phase	Temperaturänderung (°C/min) \pm SD	Dauer des Abschnitts(min)	Eingangstemperatur (°C) \pm SD	Änderung über die Dauer des Abschnitts (°C) \pm SD
Präoperativ	$0,04 \pm 0,01$	6,5	$37,7 \pm 0,3$	$0,2 \pm 0,1$
Schnitt	$-0,1 \pm 0,05$	5,0	$37,9 \pm 0,3$	$-0,2 \pm 0,3$
Ischämiezeit	$0,03 \pm 0,01$	45	$37,4 \pm 0,4$	$0,7 \pm 0,4$
Naht	$-0,08 \pm 0,04$	5,0	$38,2 \pm 0,3$	$-0,5 \pm 0,2$
Ende			$37,7 \pm 0,3$	

Die Temperaturänderung der einzelnen Phasen der IR ist in °C/min mit SD angegeben. Die Eingangstemperatur jedes Abschnitts ist angegeben, um zu zeigen, innerhalb welches Bereiches die Temperaturänderungen stattfanden. Durch das direkte Lagern der Mäuse in der Wärmekammer kann ein Abfall der Temperatur von Beginn an verhindert werden. Über die Ischämiezeit, die mit 45 Minuten die längste Phase der IR ist, betrug die Temperaturänderung insgesamt $0,7 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$. $n=5$ männlich

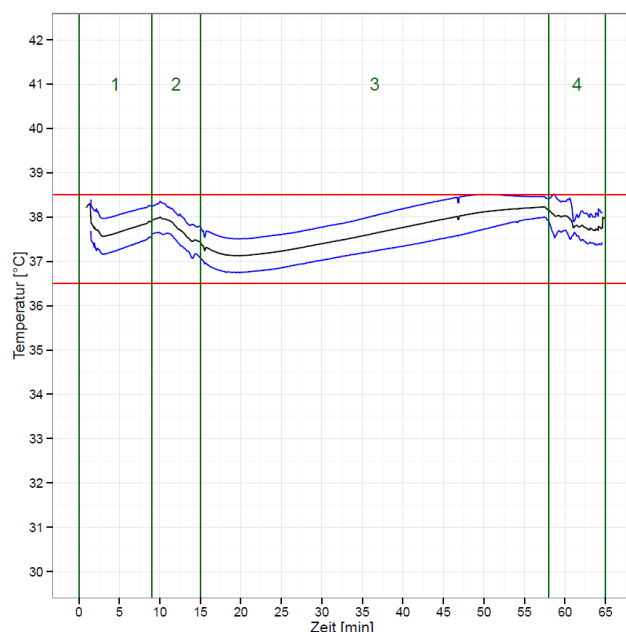


Abbildung 14: Temperaturkurven der männlichen Mäuse unter bestmöglicher Temperaturkontrolle. Protokoll wie in Tabelle 13 beschrieben. Während der Ischämiezeit fällt die Temperatur der Mäuse erst leicht ab, bevor sie dann erneut steigt. Dies könnte auf die feuchte Kompresse zurückzuführen sein. Mit anhaltender Wärmezufuhr verdampft die Feuchtigkeit etwas und die Temperaturen der Mäuse steigen wieder. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. 1: Präoperative Phase; 2: Schnittphase; 3: Ischämiezeit; 4: Nahtphase. $n=5$

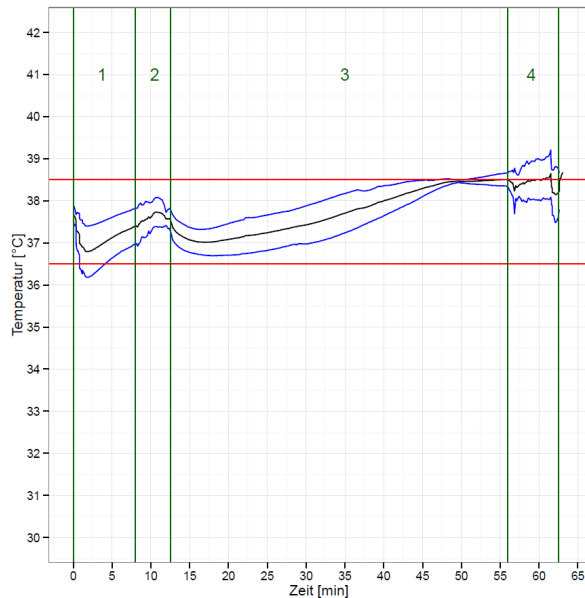


Abbildung 15: Temperaturkurven der weiblichen Mäuse unter bestmöglicher Temperaturkontrolle. Protokoll wie in Tabelle 13 beschrieben. Während der Ischämiezeit fällt die Temperatur der Mäuse erst leicht ab, bevor sie dann erneut steigt. Dies könnte auf die feuchte Kompresse zurückzuführen sein. Mit anhaltender Wärmezufuhr verdampft die Feuchtigkeit etwas und die Temperaturen der Mäuse steigen wieder. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. 1: Präoperative Phase; 2: Schnittphase; 3: Ischämiezeit; 4: Nahtphase. n=5

Vergleichende Darstellung der erreichten Temperaturen der männlichen Mäuse mit verschiedenen Versuchsaufbauten sind in Abbildung 16 dargestellt. Dabei wurde der neu etablierte Versuchsaufbau verglichen mit dem ehemals verwendeten sowie dem ehemals verwendeten Versuchsaufbau plus Wärmeplatte während der Schnitt- und Nahtphase als Zwischenstufe. Die Wärmeplatte wurde dabei so eingestellt wie im neu etablierten Versuch. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied des prozentualen Anteils im Zielbereich zwischen allen drei Gruppen. Der Mittelwert der Körpertemperatur der Mäuse ist auch für jeden Abschnitt zwischen den drei Gruppen signifikant unterschiedlich. Die Messungen der weiblichen Mäuse ergaben vergleichbare Ergebnisse und sind im Anhang zu finden.

Zusammenfassend kann man schlussfolgern, dass eine deutliche Verbesserung der Temperaturkontrolle erreicht werden konnte. Durch die einfache Anwendung der Wärmekammer wurde ein Versuchsaufbau etabliert, der benutzerabhängige Varianzen verringert und die Temperaturen der Mäuse von äußeren Faktoren unabhängiger macht. Durch die Temperaturkonstanz im Zielbereich zwischen 36.5°C und 38.5°C wurde die Vergleichbarkeit von Ergebnissen sowohl innerhalb des eigenen Labors, als auch mit externen Laboren erhöht.

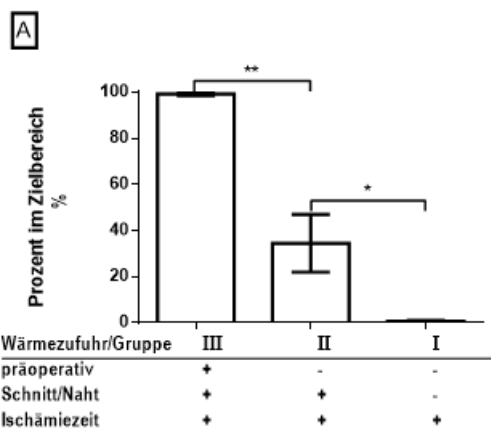
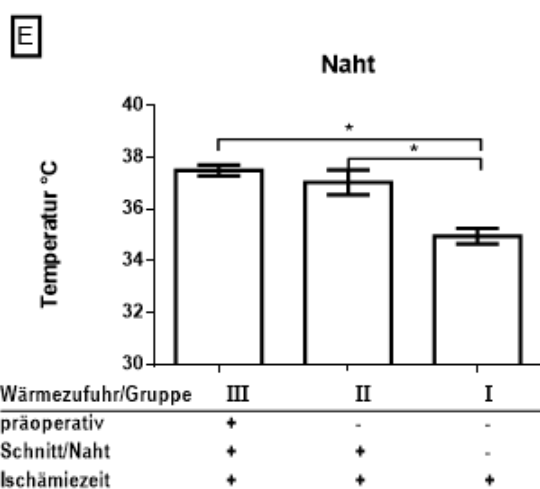
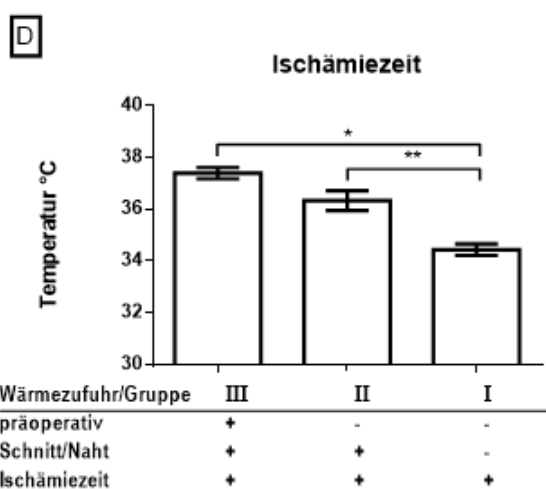
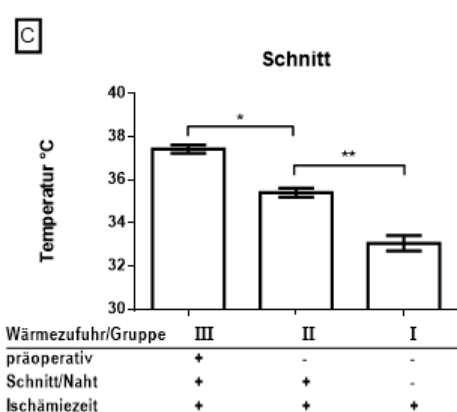
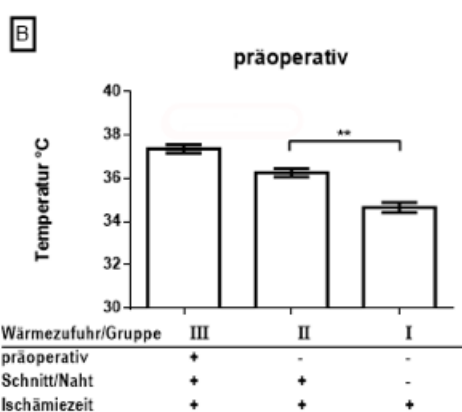


Abbildung 16: Vergleich der Temperaturkontrolle von neu etabliertem Versuchsaufbau (Wärmezufuhr in allen vier Phasen), bisher benutztem Versuchsaufbau mit zusätzlicher Wärmeplatte während der Schnitt- und Nahtphase (Wärmezufuhr während der Schnitt- und Nahtphase und der Ischämiezeit) und bisher benutztem Versuchsaufbau (Wärmezufuhr während der Ischämiezeit). n=5, männliche Mäuse. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. durch Balken angezeigte Gruppe.

A: prozentualer Anteil der gemessenen Werte im Zielbereich zwischen 36.5°C und 38.5°C. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen allen drei Gruppen. B – E: Mittlere Körpertemperatur der Mäuse über die verschiedenen Phasen präoperativ, Schnitt, Ischämiezeit und Naht. Auch hier zeigt sich ein signifikanter Unterschied der mittleren Körpertemperatur zwischen den verschiedenen Versuchsaufbauten.



3.2. Einfluss der Temperatur der Maus auf das Ausmaß der Schädigung

Um den Einfluss der verbesserten Temperaturstabilität auf das Ausmaß der tubulären Schädigung zu evaluieren, wurden verschiedenen Analysen der Nieren durchgeführt. Zum einen wurden histologische Färbungen angefertigt, gleichzeitig wurde die Genexpression verschiedener tubulärer Schädigungsmarker und inflammatorischer Marker gemessen.

3.2.1. Erhöhte tubuläre Schädigung bei verbesserter Temperaturstabilität

Um den Tubulusschaden zu beurteilen, wurden die Nieren der Mäuse einer unilateralen Abklemmung der Nierengefäße unterzogen und nach 24 stündiger Reperfusion entnommen. Das Ausmaß der tubulären Schädigung wurde anhand von PAS-Färbungen und der Expression tubulärer Marker untersucht. Aufgrund des hohen Sauerstoffbedarfs in den S3-Segmenten der proximalen Tubuli sind diese besonders anfällig für ischämische Schädigungen. Die S3-Segmente der proximalen Tubuli liegen im OSOM. Daher wurde lediglich dieser bewertet. Histologische Merkmale der tubulären Schädigung sind wie in der Einleitung näher beschrieben Verlust des Bürstensaums, Abschilferung der Epithelzellen ins Lumen, Abflachung des Epithels, Bildung hyaliner Zylinder und Nekrose der Tubuli. In den PAS-gefärbten Schnitten wurde der prozentuale Anteil der nekrotischen Tubuli an der Gesamtfläche des OSOM bewertet. Der Untersucher war dabei verblindet. Untersucht wurden die Nieren der Mäuse, deren Temperaturkontrolle in Abbildung 16 dargestellt ist. Bei den männlichen Mäusen wurde die IR mit drei verschiedenen Temperaturkontrollen, wie in Abbildung 16 dargestellt, durchgeführt, nach dem bisher etablierten Versuchsaufbau, mit zusätzlicher Wärmeplatte während der Schnitt- und Nahtphase und mit dem neu etablierten Versuchsaufbau. Bei den weiblichen Mäusen wurde die IR nach dem alten Versuchsaufbau und mit dem neuen Versuchsaufbau durchgeführt. Die Nieren wurden 24 Stunden nach der IR entnommen. Sowohl in den weiblichen, als auch in den männlichen Nieren unter stabiler Temperaturkontrolle (neu etablierter Versuchsaufbau) zeigte sich massive Nekrose der Tubuli. Diese war nicht nur auf den OSOM begrenzt, sondern ließ sich auch im Kortex nachweisen, was exemplarisch in Abbildung 17 dargestellt ist. In Abbildung 18 sind strukturell erhaltene Tubuli mit Bürstensaum der kontralateralen Niere im Vergleich zu nekrotisierten Tubuli der ischämischen Niere bei optimaler Temperaturkontrolle dargestellt.

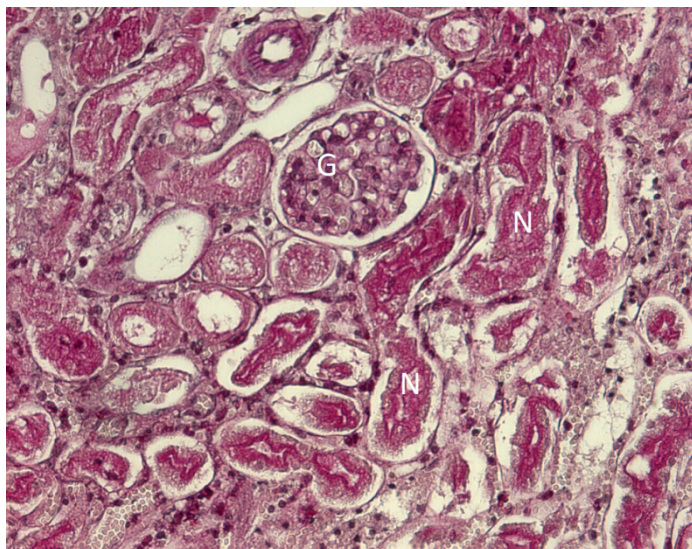


Abbildung 17: Tubulusnekrose im Kortex. Exemplarisch dargestellt ist der PAS-gefärbte Schnitt einer ischämischen Niere unter optimaler Temperaturkontrolle. Nekrotische Tubuli liegen direkt neben einem Glomerulum im Kortex. Die Nekrose ist bei optimaler Temperaturkontrolle nicht auf den OSOM, den Hypoxie empfindlichsten Teil der Niere, begrenzt, sondern betrifft auch den Kortex. G = Glomerulum, N = Nekrotischer Tubulus. 100x Vergrößerung des Lichtmikroskops

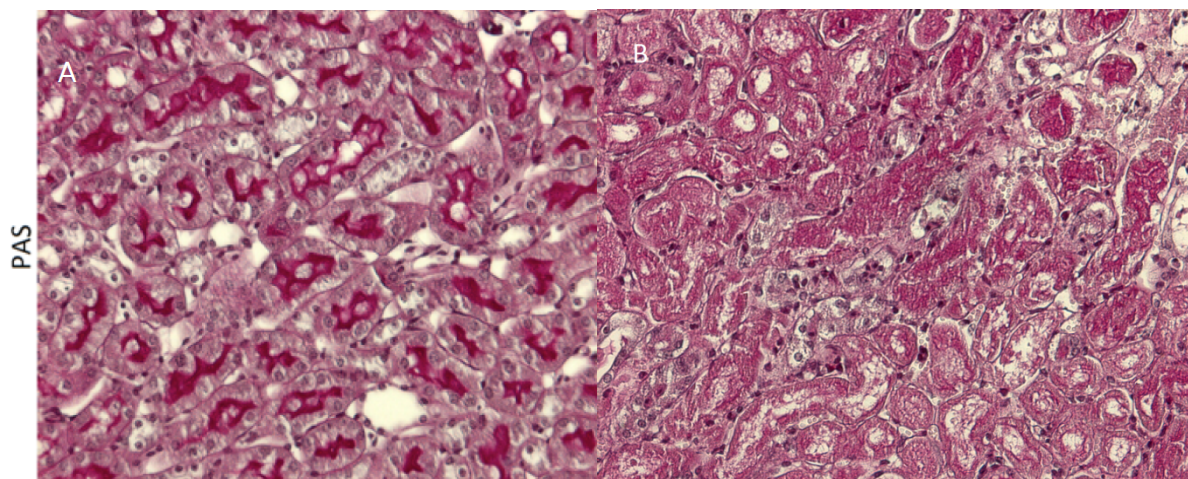


Abbildung 18: Vergleich einer kontralateralen (A) Niere mit der ischämischen (B) bei stabiler Temperaturkontrolle. Nieren nach 45 minütiger IR und 24h Reperfusion wurden mit PAS gefärbt. Dargestellt ist ein Ausschnitt aus dem OSOM der kontralateralen Niere einer Maus und der dazugehörigen ischämischen Niere unter optimaler Temperaturkontrolle. In der kontralateralen Niere sind strukturell erhaltene Tubuli mit Bürstensaum zu erkennen, in der ischämischen ausgeprägte Nekrosen. 100x Vergrößerung des Lichtmikroskops.

Der prozentuale Schaden aller Nieren einer Gruppe gemessen am nekrotischen Anteil der Tubuli an der Gesamtfläche des OSOM unter stabiler Temperaturkontrolle betrug bei den ischämischen Nieren der männlichen Mäuse $92.6 \pm 0.9\%$, der weiblichen $90.7 \pm 1.7\%$. Unter fehlender Temperaturkontrolle nach dem alten Versuchsaufbau waren $63.2 \pm 3.7\%$ der

Tubuli der männlichen Mäuse und $51.8 \pm 3.5\%$ der weiblichen Mäuse nekrotisch. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der optimalen und der fehlenden Temperaturkontrolle. $10.0 \pm 1.3\%$ der Tubuli der kontralateralen Nieren aller Gruppen wurden als nekrotisch bewertet. In allen Gruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den kontralateralen und den ischämischen Nieren der Gruppe. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 19 zusammenfassend dargestellt.

Um ergänzend zur histologischen Beurteilung des tubulären Schadens die Expression tubulärer Schädigungsmarker zu analysieren, wurde die mRNA-Expression folgender Marker bestimmt, die alle bei tubulärer Schädigung in ihrer Expression hochreguliert werden [107]: KIM-1 (Kidney Injury Molecule-1) [108], NGAL (Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin) [109], α - und π -GST (Glutathione S – Transferase). Es wurden dieselben Nieren wie auch für die PAS-Färbungen verwendet, also 45 minütige IR mit 24 Stunden Reperfusion unter verschiedenen Versuchsaufbauten zur Temperaturstabilisierung. In Abbildung 20 sind die Ergebnisse für die männlichen Mäuse dargestellt, die weiblichen sind im Anhang zu finden.

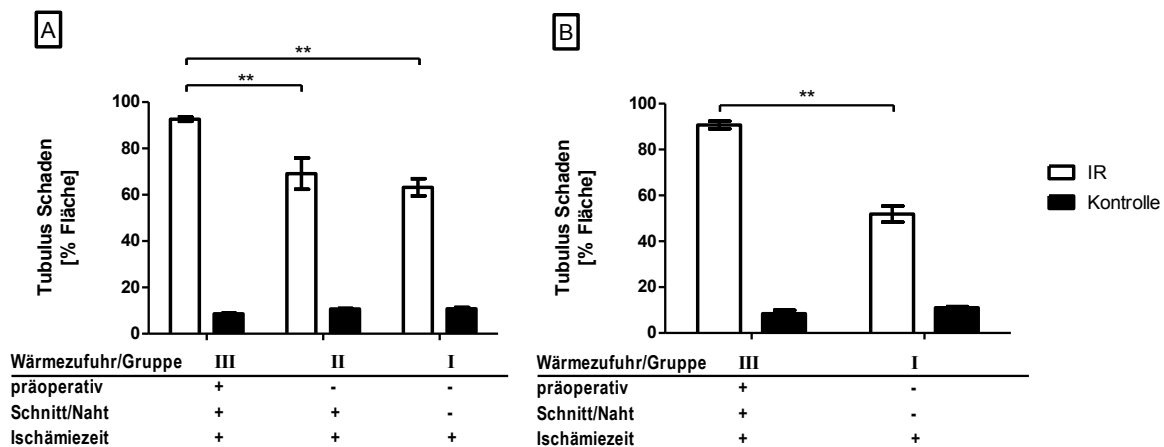


Abbildung 19: Vergleich des prozentualen Anteils der nekrotischen Tubuli an allen Tubuli mit unterschiedlicher Wärmezufuhr nach 24 stündiger Reperfusion nach 45 minütiger IR. **A:** männliche Mäuse, **B:** weibliche Mäuse. Dargestellt in der Abszisse sind die verschiedenen Versuchsaufbauten mit Wärmezufuhr in allen Phasen der IR (optimale Temperaturkontrolle), in der Schnitt-/Nahtphase und Ischämiezeit oder lediglich in der Ischämiezeit (fehlende Temperaturkontrolle). In den PAS-gefärbten Schnitten wurde der prozentuale Tubulusschaden als Anteil der nekrotischen Tubuli an der Gesamtfläche des OSOM beurteilt. Bei beiden Geschlechtern mit optimaler Temperaturkontrolle zeigt sich ein signifikant höherer Anteil an nekrotischen Tubuli als bei fehlender Temperatur. Der Schaden der kontralateralen Nieren war in allen Gruppen signifikant niedriger. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. durch Balken angezeigte Gruppe.

Es zeigen sich vergleichbare Ergebnisse. Bei den männlichen Mäusen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe III (optimale Temperaturkontrolle) und Gruppe I (fehlende Temperaturkontrolle) für KIM-1 und NGAL, α - und π -GST zeigen lediglich Tendenzen. Die kontralateralen Nieren zeigten in allen Gruppen eine signifikant niedrigere Expression obiger Marker. Zusammenfassend geht die verbesserte Temperaturstabilität mit erhöhter Expression einiger tubulärer Schädigungsmarker sowie mit vermehrter Nekrose der Tubuli einher.

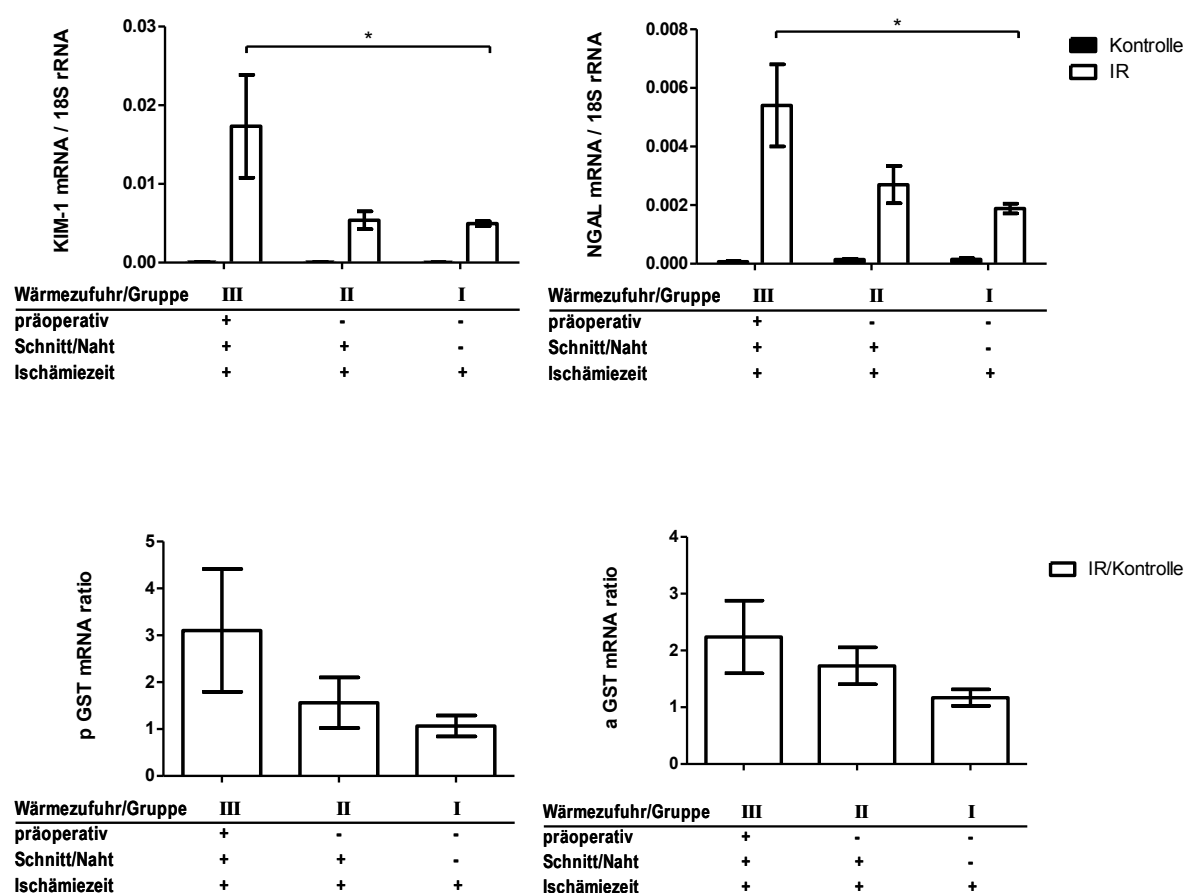


Abbildung 20: Expression tubulärer Schädigungsmarker. Dargestellt in der Abszisse sind die verschiedenen Versuchsaufbauten mit Wärmezufuhr in allen Phasen der IR (Gruppe III), in der Schnitt/Nahtphase und Ischämiezeit (Gruppe II) oder lediglich in der Ischämiezeit (Gruppe I). Der Effekt der Maustemperatur auf die tubuläre Schädigung wurde durch die Expression verschiedener tubulärer Schädigungsmarker (KIM-1, a-GST, p-GST und NGAL) analysiert. Für KIM-1 und NGAL zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe I und Gruppe III, p-GST und a-GST zeigen lediglich eine Tendenz. P-GST und a-GST wurden berechnet, indem der mRNA/ 18S rRNA Quotient der ischämischen Niere dividiert wurde durch selbigen Quotienten der kontralateralen Niere, um technisch bedingte Schwankungen des kontralateralen Quotienten zu eliminieren. N=5, männliche Mäuse. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Gruppe I.

Zusätzlich zur tubulären Schädigung wurde auch die Expression folgender proinflammatorischer Faktoren untersucht: CXCL-2, Il-6 und TNF- α . Durch die ischämische Schädigung wurde die Expression der Faktoren im Vergleich zu den kontralateralen Nieren in allen Gruppen signifikant erhöht. Die verbesserte Temperaturkontrolle in Gruppe III führte zu einer signifikant erhöhten Expression aller drei proinflammatorischen Faktoren im Vergleich zur fehlenden Temperaturkontrolle in Gruppe I. Die ischämische Schädigung geht daher mit erhöhter Expression entzündlicher Faktoren einher. In Abbildung 21 sind die Ergebnisse für die männlichen Mäuse dargestellt. Für die weiblichen Mäuse ergaben sich ähnliche Ergebnisse, die im Anhang dargestellt sind.

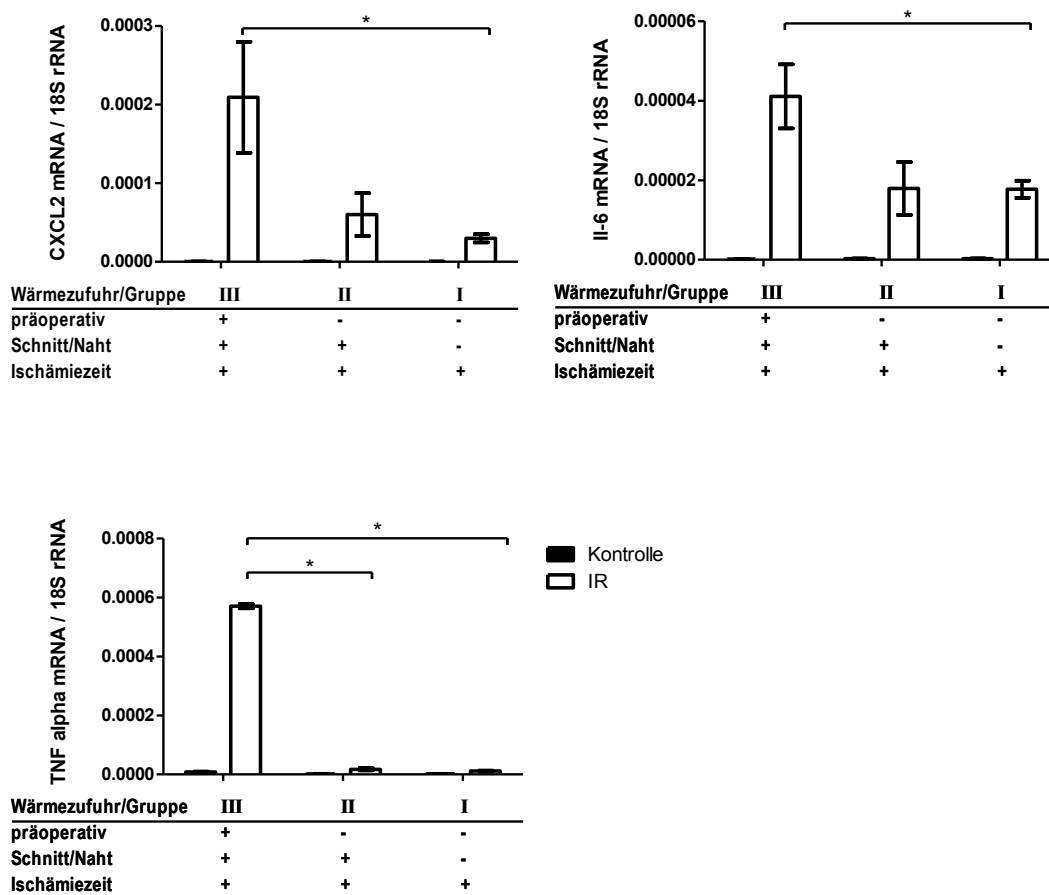


Abbildung 21: Expression proinflammatorischer Faktoren. Dargestellt in der Abszisse sind die verschiedenen Versuchsaufbauten mit Wärmezufuhr in allen Phasen der IR (Gruppe III), in der Schnitt-/Nahtphase und Ischämiezeit (Gruppe II) oder lediglich in der Ischämiezeit (Gruppe I). Der Effekt der Maustemperatur auf die Inflammation wurde durch die Expression verschiedener inflammatorischer Marker (CXCL-2, Il-6 und TNF- α) analysiert. Für alle drei zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe I und Gruppe III, bei TNF- α konnte auch zu Gruppe II ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. N=5, männliche Mäuse. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. durch Balken angezeigte Gruppe.

Die Nieren aller Mäuse wurden nach Entnahme gewogen und mit der kontralateralen verglichen. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der ischämischen und der kontralateralen Niere nur bei verbesserter Temperaturkontrolle in Gruppe III. Dabei waren die ödematös geschwollenen ischämischen Nieren schwerer als die kontralateralen. Zwischen den verschiedenen Temperaturkontrollgruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

3.2.2. Erhöhte Neutrophilen-Rekrutierung bei verbesserte Temperaturstabilität

Um zu untersuchen, ob die verbesserte Temperaturstabilität zu einer erhöhten Neutrophilen-Rekrutierung im Rahmen einer vermehrten Entzündungsreaktion führt, wurden immunhistologische Färbungen mit Ratten anti-Maus Ly-6B.2 von Nieren nach unilateraler IR angefertigt, um neutrophile Granulozyten zu identifizieren. Die so gefärbten Neutrophilen stellen sich schwarz dar. Dabei wurden dieselben Nieren benutzt, wie bereits oben für die PAS-Färbungen beschrieben. Mit 50-facher Vergrößerung wurden Photographien des OSOM gemacht. Diese wurden dann mittels Image J zugeschnitten und kolorimetrisch analysiert wie im Methodenteil beschrieben. So wurde die prozentuale mit Neutrophilen infiltrierte Fläche des OSOM gemessen. Die Quantifizierung der Leukozyteninfiltrate durch Immunfärbung zeigte massiv erhöhte Neutrophilenzahlen im OSOM der ischämischen Nieren im Vergleich zu den kontralateralen. Dies ist exemplarisch in Abbildung 22 dargestellt.

Ein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Neutrophileninfiltration zeigte sich auch zwischen den ischämischen Nieren der verschiedenen Gruppen. So ist die Neutrophileninfiltration bei optimaler Temperaturkontrolle bei den männlichen Mäusen mit $29.2 \pm 8.2\%$ signifikant höher als bei fehlender Temperaturkontrolle mit $5.7 \pm 1.5\%$. Der Unterschied zeigte sich auch bei den weiblichen Mäusen, beides ist in Abbildung 23 dargestellt.

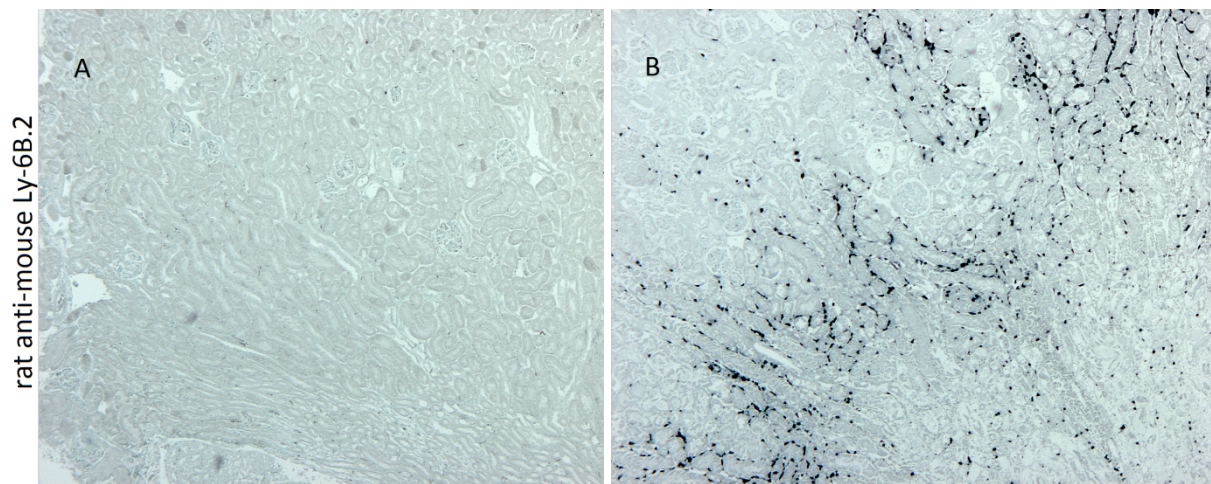


Abbildung 22: Vergleichende Darstellung der kontralateralen Niere (A) einer Maus mit der Ischämischen (B). Nieren nach 45 minütiger IR und 24h Reperfusion wurden mit Ly-6B.2 gefärbt, um Neutrophile Granulozyten-Infiltrate zu quantifizieren. Diese stellen sich schwarz dar. In der kontralateralen Niere sind keine Neutrophileninfiltrate erkennbar, in der ischämischen sind 19% des OSOMs mit Neutrophilen infiltriert. Zur Auswertung wurde der OSOM zugeschnitten. 50x Vergrößerung des Lichtmikroskops.

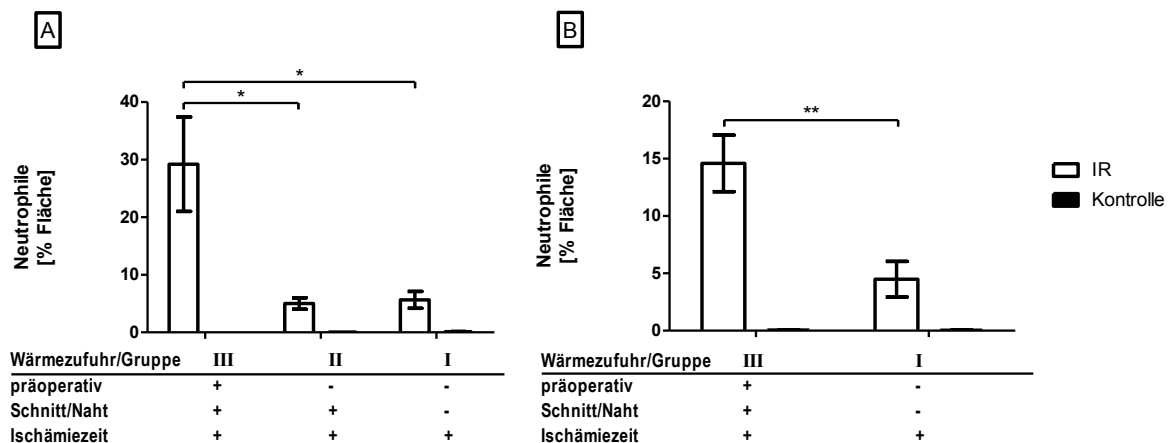


Abbildung 23: Neutrophileninfiltrate als prozentualer Anteil der Gesamtfläche (OSOM) bei männlichen (A) und weiblichen (B) Mäusen. Dargestellt in der Abszisse sind die verschiedenen Versuchsaufbauten mit Wärmezufuhr in allen Phasen der IR (optimale Temperaturkontrolle), in der Schnitt-/Nahtphase und Ischämiezeit oder lediglich in der Ischämiezeit (fehlende Temperaturkontrolle). Nieren nach 45 minütiger IR 24h nach Operation wurden mit Ratten anti-Maus Ly-6B.2 gefärbt, um neutrophile Granulozyten zu identifizieren. Bei beiden Geschlechtern zeigt sich ein signifikanter Unterschied zur kontralateralen Niere sowie zwischen der optimalen und der fehlenden Temperaturkontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. fehlende Temperaturkontrolle.

3.2.3. Kein erhöhter Verlust der proximalen Tubuli bei verbesserter Temperaturstabilität

Um zu überprüfen, ob es durch die ischämische Schädigung zu einem Verlust der Tubuli kommt, wurden Färbungen mit *Lotus tetragonobulus* Lectin angefertigt. Lectin stellt sich immunhistochemisch schwarz dar. Mittels kolorimetrischer Auswertung wurde der Anteil der Lectin-positiven Fläche an der Gesamtfläche des OSOM gemessen. Es zeigte sich kein Unterschied, weder zu den kontralateralen Nieren noch zwischen den verschiedenen Temperaturkontrollen. Dies ist graphisch in Abbildung 24 dargestellt.

Betrachtet man die Schnitte genauer, erkennt man, dass die Tubuli in den ischämischen Nieren zwar mit Lectin schwarz angefärbt wurden, aber in ihrer Morphologie gestört sind. So zeigen sich anstelle von Bürstensaum und fein aufgereihten Tubuli schwarze Konglomerate. Die Nieren wurden 24 Stunden nach IR entnommen. Zu diesem frühen Zeitpunkt ist noch kein Untergang der Tubuli erkennbar. Um sicherzustellen, ob im Verlauf ein Verlust der veränderten Tubuli stattfindet, sind weitere Untersuchungen mit späterer Organentnahme nötig.

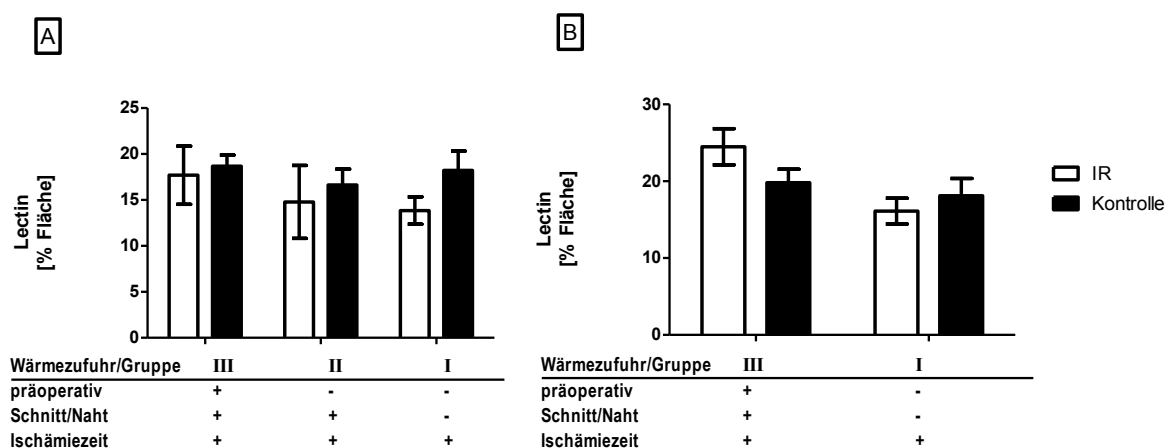


Abbildung 24: Vergleich des prozentualen Anteils der Lectin gefärbten Fläche an der Gesamtfläche des OSOM mit unterschiedlicher Wärmezufuhr. A: männliche Mäuse, B: weibliche Mäuse. Dargestellt in der Abszisse sind die verschiedenen Versuchsaufbauten mit Wärmezufuhr in allen Phasen der IR (optimale Temperaturkontrolle), in der Schnitt-/Nahtphase und Ischämiezeit oder lediglich in der Ischämiezeit (fehlende Temperaturkontrolle). Nieren nach 45 minütiger IR und 24h Reperfusion wurden mit *Lotus tetragonobulus* Lectin gefärbt um proximale Tubuli zu identifizieren. Bei beiden Geschlechtern zeigt sich kein Unterschied zur kontralateralen Niere oder zwischen den verschiedenen Temperaturkontrollen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM.

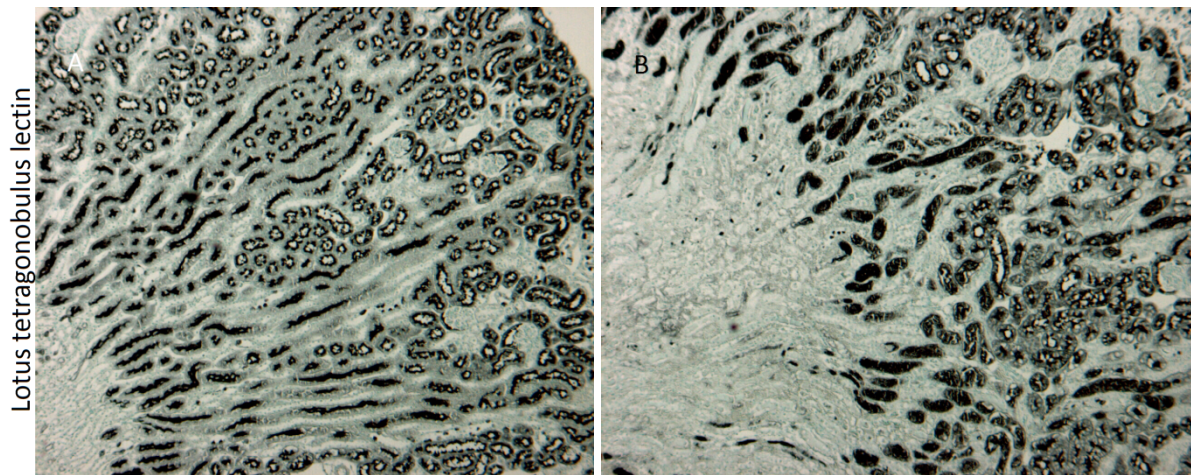


Abbildung 25: Vergleichende Darstellung der kontralateralen Niere (A) einer Maus mit der ischämischen (B). Nieren nach 45 minütiger IR und 24h Reperfusion wurden mit *Lotus tetragonobulus* Lektin gefärbt, um proximale Tubuluszellen zu identifizieren. Diese stellen sich schwarz dar. In der kontralateralen Niere ist die Morphologie der Tubuli erkennbar, in der ischämischen nicht. Dort sieht man im OSOM schwarz gefärbte Konglomerate anstelle von Tubuli. Zur Auswertung wurde der OSOM zugeschnitten. 50x Vergrößerung des Lichtmikroskops.

3.3. Einfluss der Dauer der Ischämie auf das Ausmaß der Schädigung

Eine 45 minütige Ischämie unter dem ehemals benutzten Versuchsprotokoll in unserem Labor ergab ein bestimmtes Schädigungsausmaß, welches für verschiedene Untersuchungen besonders gut geeignet war. Da die Veränderung der Temperaturstabilität wie oben beschrieben zu einem ausgeprägteren Schaden geführt hat, ist es wichtig, erneut eine vergleichbare Schädigung zu erzeugen. Dies sollte erreicht werden, indem die Dauer der Ischämie gesenkt wird. Gleichzeitig hatten die Untersuchungen zum Ziel, die Methodik zu prüfen, da nur bei stabiler Kontrolle der Variablen, insbesondere der Temperatur, eine direkt ischämiezeitabhängige Schädigung nachzuweisen ist. Die Mäuse wurden einer unilateralen IR unterzogen. Dabei wurden insgesamt vier Gruppen gebildet, die sich in der Dauer der Ischämie unterschieden. Die Dauer der Ischämie betrug in Gruppe I 15 Minuten, in Gruppe II 25 Minuten, in Gruppe III 35 Minuten und in Gruppe IV 45 Minuten. Bei allen Gruppen war die Temperatur gut kontrolliert. Abgeschätzt wurde die tubuläre Schädigung anhand von semiquantitativer Beurteilung der Nekrosen des OSOM in der PAS-Färbung und der Expression tubulärer Schädigungsmarker. Die Expression proinflammatorischer Faktoren und die Infiltration mit Neutrophilen wurden zur Beurteilung der inflammatorischen Reaktion herangezogen.

3.3.1. Das Ausmaß der tubulären Schädigung ist abhängig von der Dauer der Ischämie

Zur Beurteilung des Ausmaßes der tubulären Schädigung nach verschiedenen langen Ischämiezeiten wurden die Mäuse einer unilateralen IR unterzogen, bei der die Dauer der Ischämie je nach Gruppenzugehörigkeit 15, 25, 35 oder 45 Minuten betrug und die Temperatur mittels neu etablierten Versuchsaufbaus kontrolliert war. 24 Stunden nach IR wurden die Nieren beidseits entnommen. Die Beurteilung des Tubulusschadens erfolgte anhand von PAS-gefärbten histologischen Schnitten. Dabei wurde der Anteil der nekrotischen Tubuli an der Gesamtfläche aller Tubuli beurteilt. Es zeigte sich eine Zunahme der Schädigung mit Zunahme der Ischämiezeit. So war der Schaden nach 15 Minuten Ischämiezeit mit einem nekrotischen Anteil der Tubuli von $25.5 \pm 10.8\%$ an der Gesamtfläche des OSOM am geringsten. Mit längerer Dauer der Ischämie nahm der Schaden zu. Nach 25 Minuten Ischämiezeit waren $48.4 \pm 5.3\%$ der Tubuli im OSOM nekrotisch, nach 35 Minuten $71.4 \pm 4.9\%$ und nach 45 Minuten $92.6 \pm 2.0\%$. Der Anteil an nekrotischen Tubuli an der Gesamtfläche des OSOM war bei den kontralateralen Nieren aller vier Gruppen signifikant niedriger als die jeweilige Gruppe und betrug $8.7 \pm 0.1\%$. Dies ist graphisch in Abbildung 26 dargestellt. In Abbildung 27 ist exemplarisch ein PAS-gefärbter Querschnitt einer Niere nach 15 minütiger Ischämie im Vergleich zu einer nach 45 minütiger dargestellt.

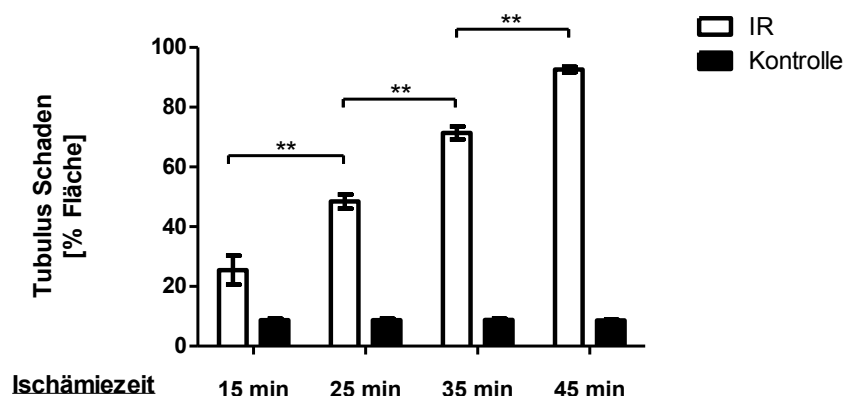


Abbildung 26: Ausmaß der tubulären Schädigung bei ansteigender Dauer der Ischämie nach 24 stündiger Reperfusion. Dargestellt in der Abszisse ist die jeweilige Dauer der Ischämie während der IR. Bei allen Gruppen war die Temperatur kontrolliert. In den PAS-gefärbten Schnitten wurde der prozentuale Tubulusschaden als Anteil der nekrotischen Tubuli an der Gesamtfläche des OSOM beurteilt. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg des Ausmaßes der tubulären Schädigung mit steigender Dauer der Ischämie. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. durch Balken angezeigte Gruppe.

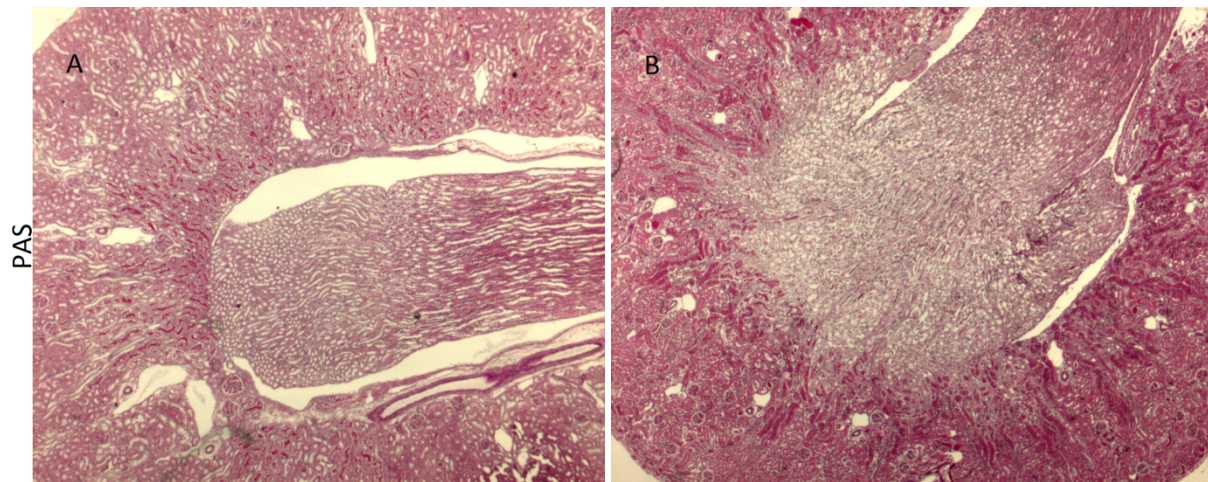


Abbildung 27: Vergleich einer ischämischen Niere nach 15 Minuten Ischämiezeit mit einer nach 45 Minuten Ischämiezeit (B) bei stabiler Temperaturkontrolle. Nieren 24h nach IR wurden mit PAS gefärbt. Exemplarisch dargestellt ist ein Querschnitt fast der gesamten Niere nach 15 minütiger bzw. 45 minütiger Ischämie. Nach 15 Minuten ist kaum ein Schaden zu erkennen. In dieser Vergrößerung sieht man besonders gut die geordnete Struktur der Niere in A im Vergleich zu B. In B ist der Übergang zur Papille unscharf begrenzt. Es zeigt sich ein ausgeprägter Tubulusschaden bis in den Kortex der Niere. 25x Vergrößerung des Lichtmikroskops.

Ergänzend wurde das Ausmaß der tubulären Schädigung auch anhand der Expression tubulärer Schädigungsmarker gemessen. Dabei wurde analog zu den oben beschriebenen Temperaturkontrollen die Expression der Gene KIM-1, NGAL, α - und π -GST gemessen. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der NGAL Expression von der 15 minütigen, 25 minütigen und 35 minütigen Ischämiezeit zur 45 minütigen Ischämiezeit. Für KIM-1 ließ sich die gleiche Tendenz erkennen, allerdings ohne Signifikanz. Die Expression von π -GST war nach 45 minütiger und 35 minütiger Ischämiezeit signifikant höher als nach 25 minütiger. Für α -GST zeigte sich kein ischämiezeitenabhängiger Unterschied der Expressionsraten. Insgesamt konnte eine Abhängigkeit der Expression tubulärer Schädigungsmarker von der Dauer der Ischämie gesehen werden, diese war aber nicht für alle Marker nachweisbar oder zum Teil nur als Tendenz erkennbar. Erneute Versuche mit einer höheren Probenzahl könnten dazu beitragen, die Tendenz als signifikant zu belegen oder als nicht signifikant zu verwerfen.

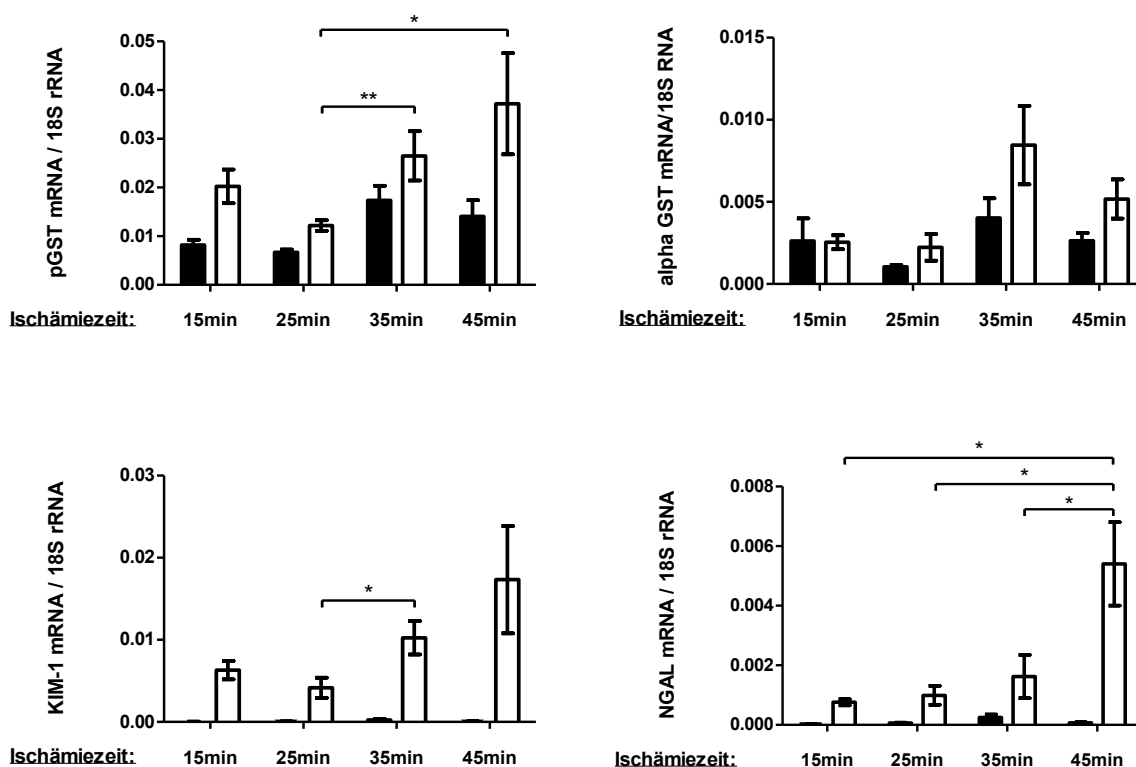


Abbildung 28: Expression tubulärer Schädigungsmarker bei verschiedenen langer Dauer der Ischämie. Dargestellt in der Abszisse ist die jeweilige Dauer der Ischämie während der IR. Der Effekt der Länge der Ischämiezeit auf die tubuläre Schädigung wurde durch die Expression verschiedener tubulärer Schädigungsmarker (KIM-1, a-GST, p-GST und NGAL) beurteilt. Für NGAL zeigt sich ein signifikanter Anstieg von den kürzeren Ischämiezeiten zur 45 minütigen Ischämiezeit. Dies trifft nur teilweise für die anderen Marker zu. So konnte ein signifikanter Anstieg der Expression von p-GST von der 25 minütigen bis zur 35 minütigen bzw. 45minütigen Ischämiezeit gezeigt werden. Expression von a-GST zeigte keine Abhängigkeit von der Ischämiezeit. N=5, männliche Mäuse. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. durch Balken angezeigte Gruppe.

3.3.2. Die Abhängigkeit der entzündlichen Antwort von der Dauer der Ischämiezeit

Um zu untersuchen, ob die Dauer der Ischämie während der IR einen Einfluss auf das Ausmaß der entzündlichen Antwort hat, wurden Mäuse für 15, 25, 35 oder 45 Minuten einer unilateralen Abklemmung der Niere unterzogen. Nach 24 Stunden Reperfusion wurden die Nieren entnommen und mit Ratten anti-Maus Ly6B.2 gefärbt, um Neutrophile Granulozyten zu identifizieren. Die Nieren wurden fotografiert und wie im Methodenteil beschrieben mittels kolorimetrischer Analyse ausgewertet. Dabei wurde der Anteil an Neutrophilen an der Gesamtfläche des OSOM gemessen. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Neutrophileninfiltration mit zunehmender Dauer der Ischämie. So waren nach 15 minütiger

Ischämie $1.3 \pm 1.1\%$ des OSOMs mit Neutrophilen infiltriert, nach 25 minütiger Ischämie $9.8 \pm 3.2\%$, nach 35 minütiger Ischämie $12.3 \pm 3.7\%$ und nach 45 minütiger Ischämie $34.7 \pm 14.9\%$. Dies ist auch in Abbildung 29 dargestellt und zur Verdeutlichung anhand einer Färbung nach 15 minütiger bzw. 45 minütiger Ischämiezeit exemplarisch in Abbildung 30.

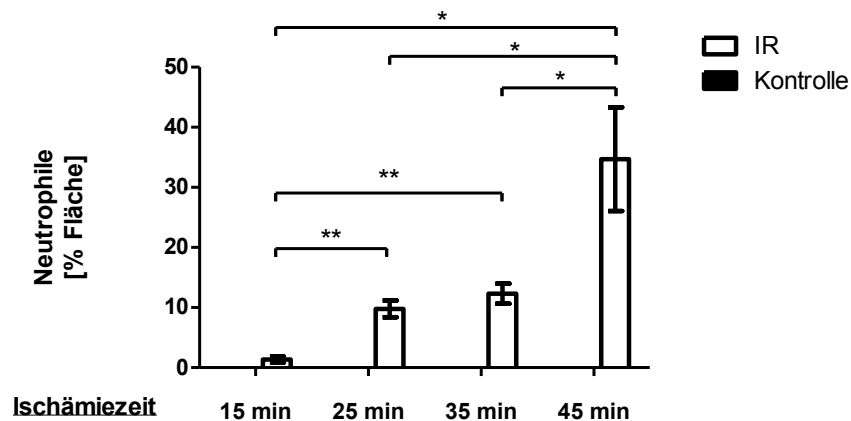


Abbildung 29: Neutrophileninfiltrate als prozentualer Anteil der Gesamtfläche des OSOM bei verschieden langer Dauer der Ischämie. Dargestellt in der Abszisse ist die jeweilige Dauer der Ischämie während der IR. Nieren 24h nach IR wurden mit Ratten anti-Maus Ly6B.2 gefärbt, um Neutrophile Granulozyten zu identifizieren. Mittels kolorimetrischer Analyse wurde der Anteil der Neutrophilen an der Gesamtfläche des OSOM gemessen. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg des Anteils der Neutrophileninfiltrate mit Zunahme der Dauer der Ischämie. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. durch Balken angezeigte Gruppe.

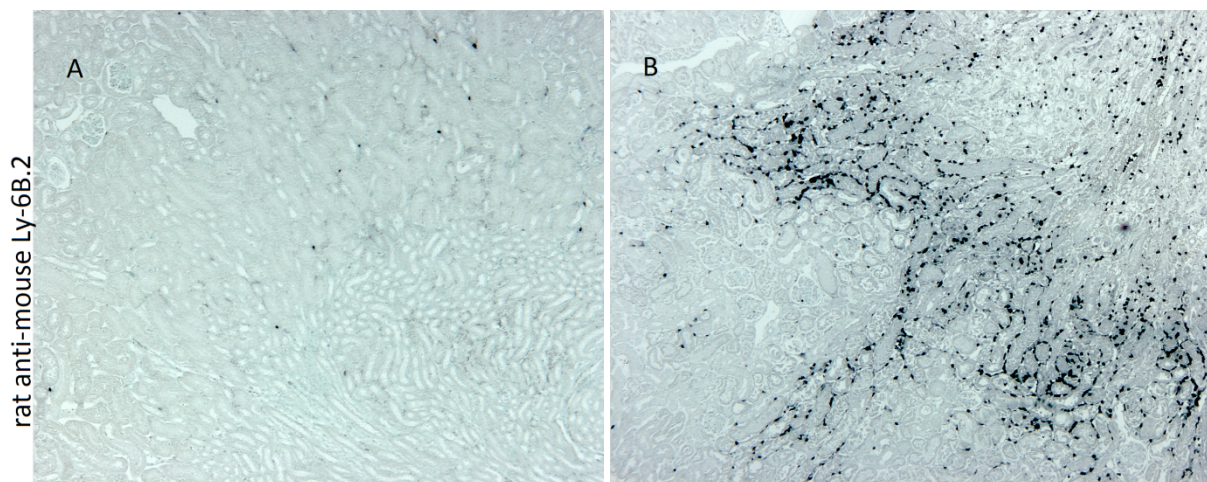


Abbildung 30: Vergleich einer ischämischen Niere nach 15 Minuten Ischämiezeit (A) mit einer nach 45 Minuten Ischämiezeit (B) bei stabiler Temperaturkontrolle. Nieren 24h nach IR wurden mit Ly-6B.2 gefärbt, um Neutrophile Granulozyten Infiltrate zu quantifizieren. Diese stellen sich schwarz dar. Dargestellt ist ein Ausschnitt des OSOM einer Niere nach 15 minütiger bzw. 45 minütiger Ischämie. Nach 15 minütiger Ischämie sind einzelne Neutrophile zu erkennen, nach 45 minütiger Ischämie Neutrophileninfiltrate entsprechend 25% des OSOMs. Zur Auswertung wurde der OSOM zugeschnitten. 50x Vergrößerung des Lichtmikroskops.

Zur Komplementierung der Ergebnisse wurde die entzündliche Antwort auch anhand der Genexpression verschiedener proinflammatorischer Faktoren untersucht. Dafür wurde die Expression von CXCL-2, TNF α , MCP-1 und Il-6 in den ischämischen und kontralateralen Nieren gemessen. Auch hier zeigte sich ein signifikanter Anstieg der entzündlichen Antwort mit steigender Ischämiezeit. Die Expression von CXCL-2, TNF α und MCP-1 war nach 15 minütiger und 25 minütiger Ischämie sehr niedrig, es zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die Expression aller vier Gene war nach 45 Minuten Ischämiezeit signifikant höher als bei allen anderen Ischämiezeiten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 zusammenfassend dargestellt.

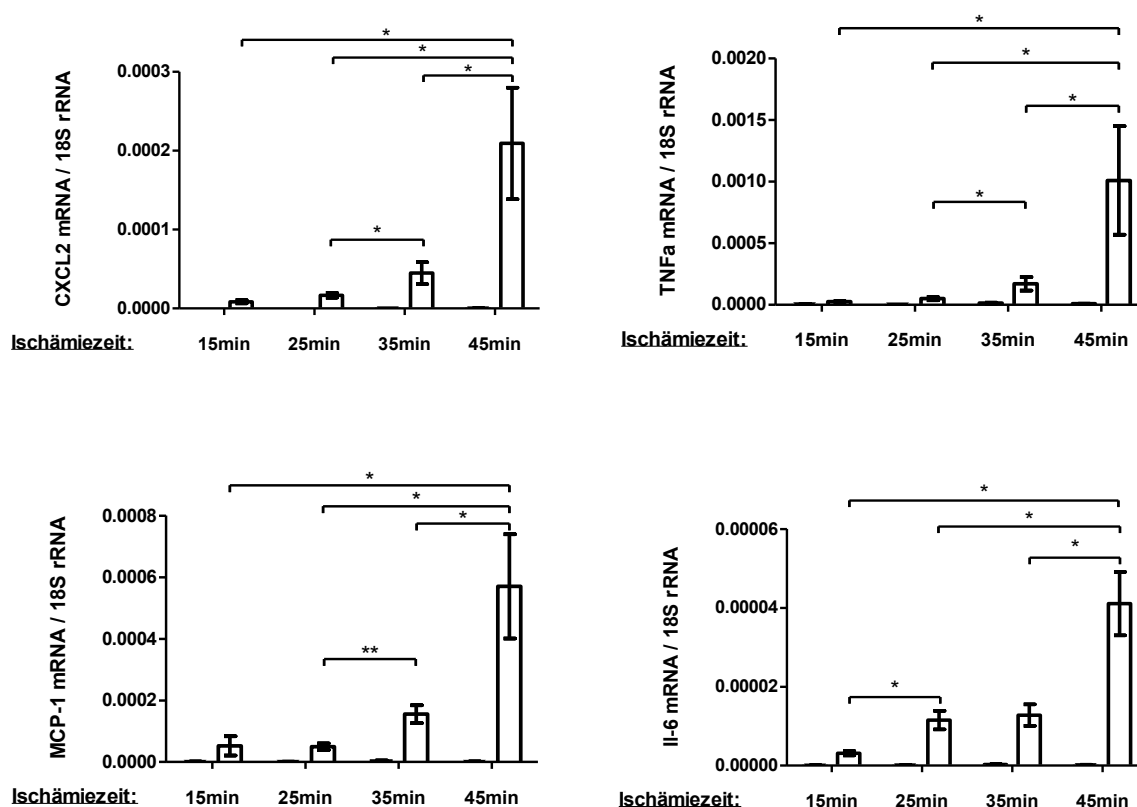


Abbildung 31: Expression proinflammatorischer Marker bei verschieden langer Dauer der Ischämie.

Dargestellt in der Abszisse ist die jeweilige Dauer der Ischämie während der IR. Der Effekt der Länge der Ischämiezeit auf die entzündliche Antwort wurde anhand der Expression verschiedener proinflammatorischer Faktoren (CXCL2, TNF α , MCP-1 und Il-6) gemessen. Dabei zeigte sich für alle Gene ein signifikanter Anstieg der Expression von 15 minütiger, 25 minütiger und 35 minütiger Ischämiezeit jeweils zur 45 minütigen Ischämiezeit. Für CXCL-2, TNF α und MCP-1 zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Expression nach 35 minütiger Ischämiezeit zur 25 minütigen Ischämiezeit. Bei Il-6 konnte ein signifikanter Anstieg der Expression nach 25 minütiger Ischämiezeit im Vergleich zur 15 minütigen Ischämiezeit nachgewiesen werden. N=5, männliche Mäuse. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. durch Balken angezeigte Gruppe.

3.3.3. Fehlender Einfluss der Ischämiezeit auf den Verlust proximaler Tubuli

Um zu überprüfen, ob es mit länger dauernder Ischämie während der IR zu einem vermehrten Verlust der proximalen Tubuli kommt, wurden Färbungen mit *Lotus tetragonobulus* Lectin angefertigt. Lectin stellt sich immunhistochemisch schwarz dar. Mittels kolorimetrischer Auswertung wurde der Anteil der Lectin-positiven Fläche an der Gesamtfläche des OSOM gemessen. Es zeigte sich kein Unterschied, weder zu den kontralateralen Nieren noch zwischen den verschiedenen Ischämiezeiten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 dargestellt. Sieht man sich allerdings die Schnitte genauer an, kann man wie auch schon bei den verschiedenen Temperaturkontrollen feststellen, dass nach länger andauernder Ischämie die Morphologie der Tubuli im Gegensatz zur kürzeren Ischämie verändert ist. Man sieht schwarz gefärbte Konglomerate anstelle von Tubuli mit Bürstensaum. Auch kann man Tubuli erkennen, die weniger intensiv schwarz gefärbt sind und eine bröckelige Struktur aufweisen. Dies könnten erste Hinweise auf einen eventuell noch stattfindenden Verlust der proximalen Tubuli sein. Anhand dieser Methode zeigt sich nach 24stündiger Reperfusion jedoch kein Verlust der proximalen Tubuli.

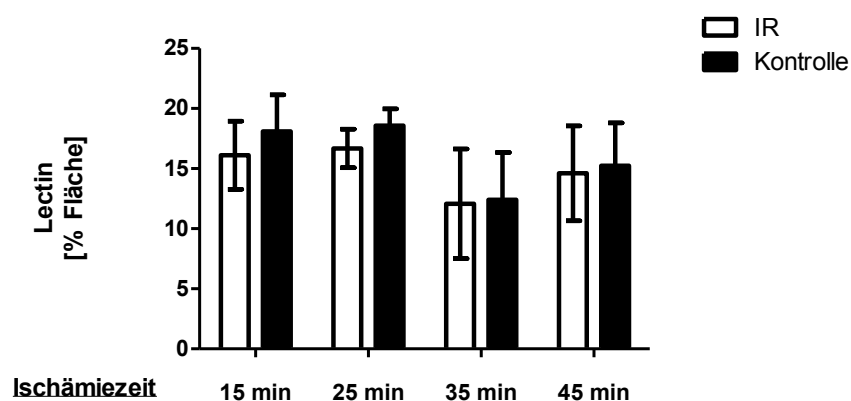


Abbildung 32: Vergleich des prozentualen Anteils der Lectin gefärbten Fläche an der Gesamtfläche des OSOM mit unterschiedlich langer Dauer der Ischämiezeit. Dargestellt in der Abszisse ist die jeweilige Dauer der Ischämie während der IR. Nieren 24h nach IR wurden mit *Lotus tetragonobulus* Lectin gefärbt um proximale Tubuli zu identifizieren. Es zeigt sich kein Unterschied zur kontralateralen Niere oder zwischen den verschiedenen Ischämiezeiten. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM.

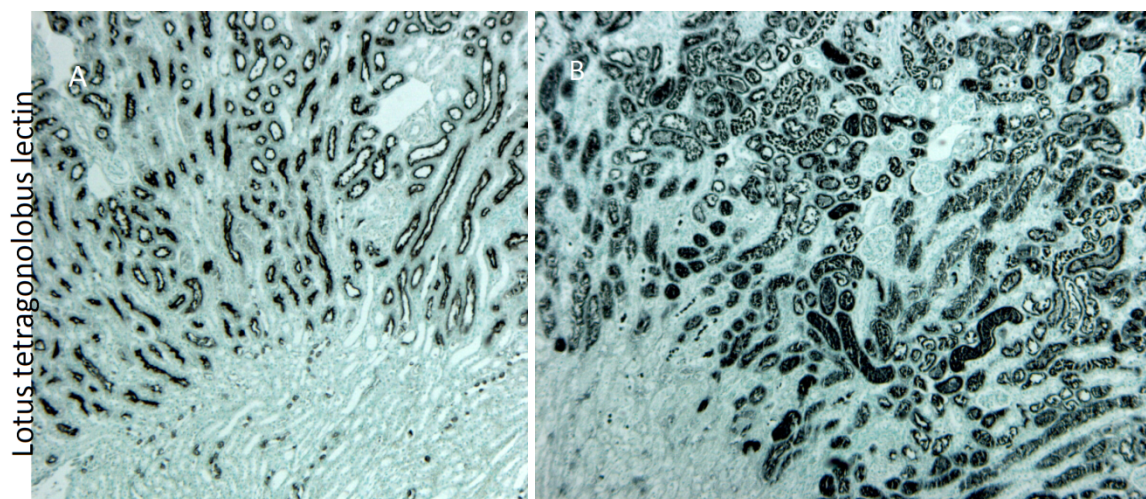


Abbildung 33: Vergleich einer ischämischen Niere nach 15 Minuten Ischämiezeit (A) mit einer nach 45 Minuten Ischämiezeit (B). Nieren 24h nach IR wurden mit *Lotus tetragonolobus* Lectin gefärbt, um proximale Tubuluszellen zu identifizieren. Diese stellen sich schwarz dar. In der Niere nach 15 Minuten Ischämie sind die Morphologie der Tubuli und das Lumen erkennbar, in der nach 45 minütiger IR nicht. Dort sieht man im OSOM an manchen Stellen schwarz gefärbte Konglomerate anstelle von Tubuli und an anderen Stellen weniger intensiv gefärbte Tubuli, die ein erster Hinweis auf einen Verlust der proximalen Tubuli sein könnten. Zur Auswertung wurde der OSOM zugeschnitten. 50x Vergrößerung des Lichtmikroskops.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene Varianten des Versuchsaufbaus zu untersuchen, um es zu ermöglichen, die Körperkerntemperatur der Mäuse während der operativen ischämischen Reperfusion stabil zu halten und so einen der wichtigsten Einflussfaktoren auf die ischämische Schädigung konstant zu halten, einen geeigneten ischämischen Stimulus zu garantieren und adäquate Vergleiche zwischen verschiedenen therapeutischen Interventionen zu ermöglichen. Weiterhin wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine konstantere, also höhere Körperkerntemperatur der Mäuse zu einer ausgeprägteren ischämischen Schädigung führt. Zusätzlich wurde angenommen, dass mit einer guten Temperaturkonstanz und Kontrolle weiterer Variablen bei der Ischämischen Reperfusion die Schädigung größtenteils durch die Ischämiezeit bestimmt wird und mit Dauer der Ischämiezeit zunimmt.

Die Erhaltung der Körperkerntemperatur der Mäuse im vorab definierten Zielbereich von 36,5 bis 38,5°C während der operativen ischämischen Reperfusion der Niere konnte in dieser Arbeit schrittweise erzielt werden. Es konnte ferner gezeigt werden, dass es nach 24 Stunden Reperfusion durch die Erhaltung der Körperkerntemperatur und damit insgesamt höheren Körperkerntemperaturen zu einer vermehrten tubulären Schädigung gemessen an der Expression tubulärer Schädigungsmarker wie KIM-1 und NGAL kommt. Auch die in der PAS-Färbung histologisch sichtbaren Nekrosen in den Tubuli waren zahlreicher vorhanden. Desweiteren kommt es durch eine konstantere und höhere Körperkerntemperatur der Tiere zu einer vermehrten Inflammation, gemessen an der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten im geschädigten Areal sowie der vermehrten Expression proinflammatorischer Marker wie TNF-alpha, Il-6 und CXCL-2. Weiterhin konnten wir zeigen, dass bei konstanter Körperkerntemperatur das Ausmaß der ischämischen Schädigung mit der Dauer der Ischämiezeit ansteigt und die Ischämiezeit so als Stellschraube der experimentell induzierten Schädigung dienen kann. Dabei konnte sowohl eine vermehrte tubuläre Schädigung als auch eine vermehrte inflammatorische Reaktion nachgewiesen werden.

Auch wenn sich über die Möglichkeiten der Übertragung von Ergebnissen aus Tierexperimenten auf den Menschen im Allgemeinen und dieses Modells im Besonderen

kontrovers diskutieren lässt, ist die warme ischämische Reperfusion auch mangels anderer Modelle und Möglichkeiten dennoch das derzeit am häufigsten benutzte Tiermodell der akuten Nierenschädigung [66]. Die Bedeutung dieser Arbeit liegt dabei vor allem in der Verbesserung und Standardisierung der Methodik sowie Minimierung von Einflussfaktoren und Validierung der Ergebnisse durch online-Temperatur-Monitoring, um somit adäquate Vergleiche zwischen verschiedenen Interventionen zu ermöglichen. Dabei wird in den folgenden Abschnitten noch ausführlich auf die Möglichkeiten der Erhaltung der Körperkerntemperatur, den Einfluss der Temperatur und den Einfluss der Ischämiezeit auf die ischämische Schädigung eingegangen.

4.1. Temperaturkontrolle

Die erste Hypothese dieser Arbeit widmete sich der Möglichkeit der Erhaltung der Körperkerntemperatur der Mäuse während der IR. Um diese Frage zu beantworten, wurde zuerst ein Zielbereich der Körpertemperatur definiert, innerhalb dessen von einer guten Temperaturkonstanz ausgegangen werden kann. In der Literatur lassen sich unterschiedliche Angaben zur rektal gemessenen Körperkerntemperatur der Mäuse finden. So wurden rektale Temperaturen zwischen 36.5°C und 38°C [96], Tagestemperaturen zwischen 36.5°C und 38°C [110] und basale Rektaltemperaturen von C57Bl/6N Mäusen von $38.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$ [97], [98] gemessen. Die von uns durchgeführten Messungen ergaben Rektaltemperaturen von 36.9°C bis 37.9°C. In Zusammenschau der Literatur und unserer Werte sowie der technischen Möglichkeiten entschieden wir uns daher für einen Zielbereich der gemessenen Rektaltemperaturen von $37.5 \pm 1^\circ\text{C}$. Alle gemessenen Werte der Körperkerntemperaturen der Mäuse während der gesamten IR sollten in diesem Bereich liegen und innerhalb selbigem möglichst geringen Schwankungen unterliegen.

4.1.1. Fehlende Temperaturkonstanz beim bisherigen Versuchsaufbau

Der Einfluss der Temperatur auf die ischämische Schädigung ist wie weiter unten aufgeführt allseits bekannt. Schlecht untersucht ist allerdings die tatsächliche Körperkerntemperatur der Mäuse während der Ischämischen Reperfusion. Durch Messung der Körperkern-

temperatur der Mäuse mittels Rektalsonden konnten wir feststellen, dass mit dem vor Beginn dieser Arbeit in unserem Labor etablierten Versuchsaufbau die Körperkerntemperaturen der Mäuse starken Schwankungen unterlagen und im Schnitt deutlich zu kalt waren. Dabei lagen die gemessenen Werte zwischen 32°C und 40°C mit dem Tiefpunkt zum Ende der operativen Ischämieinduktion, der Schnittphase. In vielen Publikationen, welche die IR verwenden, findet man Sätze wie folgenden: (ins Deutsche übersetzt) *Die Körpertemperatur wurde bei 37°C konstant gehalten, indem die Maus auf eine Wärmeplatte platziert wurde* [111]. Daten zu kontinuierlichen Messungen der Körpertemperatur der Mäuse während der IR, wie in dieser Arbeit, ließen sich nicht finden. Häufig wird eine Wärmeplatte verwendet, die, mit der Rektalsonde gekoppelt, selbständig die gemessene Körpertemperatur der Maus konstant halten soll [112]. In anderen Publikationen wurden die Mäuse auf einer meist 37°C warmen Platte gelagert in der Annahme, so auch die Körperkerntemperatur bei 37°C zu halten [109] [113]. Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit ließ sich jedoch feststellen, dass die auf der Wärmeplatte eingestellte Temperatur keineswegs der Körpertemperatur der Mäuse entsprach, sondern diese deutlich niedriger lag. Zudem zeigte sich eine starke Abhängigkeit von der Oberflächenstruktur der verwendeten Wärmeplatte. Auch bei gekoppelter Verwendung von Rektalsonde und Wärmeplatte besteht ohne zeitgleiche unabhängige Temperaturmessung keine Möglichkeit, die tatsächliche Körpertemperatur und die Qualität der Regulation zu überprüfen. Aufgrund der unzureichenden Angaben in den Methodenbeschreibungen vergleichbarer Veröffentlichungen erfolgten explizite Anfragen an die jeweils korrespondierenden Autoren mit der Bitte um die genauen Versuchsprotokolle. Von zehn angeschriebenen Autoren kam bedauerlicherweise lediglich eine Rückmeldung. Diese Arbeitsgruppe verwendet eine warm-Wasser-zirkulierende-Wärmeplatte, welche auf 42°C eingestellt ist. Messungen der Körperkerntemperatur der Mäuse wurden nicht durchgeführt. In unserem Labor kam es bei Verwendung einer Versuchsanordnung mit Koppelung von Rektalsonde und Wärmeplatte häufig zur Überhitzung der Tiere mit nachfolgend frühzeitigem Versterben, sodass wir von dieser Methode Abstand nahmen. Eine mögliche Ursache der beschriebenen Problematik könnte in der Messung selbst liegen. Gerade bei bilateralen Modellen mit medianer Laparatomie kann es dazu kommen, dass die Rektalsonde sehr nahe an der Laparatomiestelle zu liegen kommt und so nicht die tatsächliche Körperkerntemperatur der Maus, sondern deutlich niedrigere, von der Außentemperatur beeinflusste Werte misst. Die Wärmeplatte würde aufgrund falsch

niedriger Messungen hochreguliert, ohne dass dies zum Erhalt der Körperkerntemperatur notwendig wäre, und die Maus wird zu stark erhitzt. Diesbezüglich ließ sich keine Literatur finden, sodass sich über die Zuverlässigkeit der Kontrolle der Körperkerntemperatur mittels rektaler Sonde gekoppelter Wärmeplatte nur spekulieren lässt.

Dennoch sind Rektalsonden eines der genauesten Geräte zur Messung der Körperkerntemperatur mit vergleichsweise geringer Fehleranfälligkeit. Auch wir verwendeten für unsere Messung Rektalsonden, welche eine live-Messung der Körperkerntemperatur der Mäuse erlaubten und durch 3 Messungen pro Sekunde eine hohe zeitliche Auflösung garantierten. Wie Caro et al. [114] zeigen konnten, besteht eine hohe Korrelation zwischen der rektalen Temperaturmessung von Mäusen in Narkose und implantierten Chips. Weiterhin verwendeten wir in unserem unilateralen Modell einen Flankenschnitt und keine Laparatomie und achteten während der Prozedur auf die korrekte und sichere Lage der Rektalsonden, um Verfälschung der Messungen durch Lageabweichungen wie oben beschrieben zu vermeiden. Durch die so durchgeführten Messungen der Körperkerntemperatur konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Kontrolle der Körperkerntemperatur der Mäuse während der IR in unserer Arbeitsgruppe bisher unzureichend war. Durch die simultane Messung der Körpertemperatur während des gesamten ischämischen Reperfusion-Versuchs konnte eine abschnittsweise Temperaturanalyse durchgeführt werden. So konnte im Verlauf der direkte Einfluss verschiedener wärmezuführender Geräte und Einstellungen auf die Körperkerntemperatur der Mäuse beobachtet werden und durch gezielte Änderungen in der Methodik konnte diese direkt beeinflusst werden.

4.1.2. Verbesserte Temperaturstabilität in Narkose

Die Notwendigkeit der Wärmezufuhr sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen in Narkose zum Erhalt der Körpertemperatur sind vielfach beschrieben [76], [82]. Ursächlich ist, wie auch in der Einleitung beschrieben, eine Abschwächung der Thermoregulation und so verminderte Möglichkeiten zum Erhalt der Körpertemperatur [82]. Dabei sind Nagetiere mit einer vergleichsweise großen Körperoberfläche im Verhältnis zum Körpergewicht besonders anfällig für schnelle Temperaturabfälle [76]. Zur Reduktion der Variabilität bei der ischämischen Reperfusion ist daher ein Versuchsaufbau, welcher eine konstante

Erhaltung der Körpertemperatur der Maus gewährleistet, unerlässlich. Dabei sollte die Methodik unabhängig von tages- oder jahreszeitlichen Schwankungen sein. Wie die initialen Messungen zeigten, wurde die Körperkerntemperatur der Mäuse während der IR nicht konstant gehalten und war durch äußere Bedingungen leicht zu beeinflussen. Zur Entwicklung eines Versuchsaufbaus mit verbesserter Temperaturkonstanz wurden die Geräte zuerst an Tieren in Narkose getestet. Die somit gewonnenen Ergebnisse machten zwar weitere finale Untersuchungen an Tieren in IR notwendig, erlaubten aber neben ersten Rückschlüssen über die Wirkung verschiedener Geräte und Einstellungen auf die Temperaturerhaltung der Tiere kleinere Fallzahlen (*Reduction*) und weniger invasive Prozeduren an den Tieren (*Refinement*) [72]. Zur Temperaturkontrolle in Narkose verwendeten einige Arbeitsgruppen Wärmeplatten oder zirkulierende Warm-Wasser-Decken [57],[73]. Wir entschieden uns als ersten Schritt zur Stabilisierung der Körpertemperatur in unseren Versuchen für das Hinzuziehen einer Wärmeplatte während der Schnitt- und Nahtphasen, in welchen der Temperaturabfall zuvor am schnellsten stattfand. Hierdurch konnten keine durchschlagenden Erfolge erzielt werden. Es konnte zwar der Abfall der Körperkerntemperatur während der Schnittphase von $-0.42 \pm 0.12^{\circ}\text{C}/\text{min}$ auf $-0.14 \pm 0.08^{\circ}\text{C}/\text{min}$ verringert werden, eine Stabilisierung der Körperkerntemperatur trat jedoch vorerst nicht ein. Auffallend war allerdings, dass bereits zu Beginn der Narkose die Maßnahmen zum Erhalt der Körperkerntemperatur insuffizient waren. So fiel die Körperkerntemperatur der Mäuse unter einer Wärmelampe vor Beginn der operativen Intervention bereits um $0.19 \pm 0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ und die Mäuse waren bereits vor Induktion der Ischämie hypotherm mit Werten um $34.2 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$. Leider ließ sich in der Literaturrecherche keine ausführliche Beschreibung der in anderen Gruppen verwendeten Methodik zum Erhalt der Körpertemperatur vor Erreichen der chirurgischen Toleranz finden, sodass keine vergleichbare Methode zum Erhalt der Körpertemperatur zur Verfügung stand. Um bereits präoperativ eine gute Temperaturkontrolle zu erreichen, sollte die Körpertemperatur von Beginn an nicht abfallen. Die Verwendung einer Wärmeplatte schien daher schwierig, da die Tiere zu Beginn der Narkose zwar bereits eingeschränkte Temperaturregulationsmechanismen haben, aber für einen gewissen Zeitraum weiterhin in der Lage sind sich fortzubewegen und nicht auf einer Wärmeplatte liegen bleiben. Daher bedurfte es eines abgeschlossenen Raumes, wie zum Beispiel eines Käfigs mit Wärmelampe, wie bereits im ursprünglichen Versuchsaufbau etabliert. Da sich hierdurch jedoch keine suffiziente Temperaturkontrolle erreichen ließ und die Temperatur abhängig von der Nähe zur

Wärmelampe variabel blieb, wurden weitere Maßnahmen notwendig. Ziel war es, die Körpertemperatur durch konstante Wärmezufuhr von allen Seiten möglichst physiologisch zu erhalten, sodass es nicht zu lokalen Temperaturunterschieden in der Maus und der Niere kommt. Am besten geeignet schien daher eine Wärmekammer. Nach Testung der Materialeigenschaften wurde schließlich ein Eierbrüter als Wärmekammer zur präoperativen Temperaturstabilisierung verwendet. Die Verwendung einer Wärmekammer wurde bisher zur Temperaturstabilisierung bei operativen Modellen an Mäusen nicht beschrieben und stellt mit ihrer wesentlich physiologischeren Zufuhr von Wärme im Vergleich zur Wärmeplatte eine Weiterentwicklung dar. Durch die abgeschlossene Kammer sind die Versuche weniger abhängig von der Umgebungstemperatur als bei dem alleinigen Gebrauch von Wärmeplatten. Gleichzeitig brachte die präoperative Stabilisierung der Körperkern-temperatur eine wesentliche Verbesserung mit sprunghaftem Anstieg der prozentualen Werte im Zielbereich von 34.6% auf 99.3%. So konnte in unseren Versuchen durch Einführung einer Wärmeplatte während der Schnitt- und Nahtphasen und durch Hinzuziehen der Wärmekammer in der präoperativen Phase und der Ischämiezeit eine gute Temperaturkontrolle in Narkose unter verbesserten physiologischen Bedingungen erreicht werden, welche so in der Literatur noch nicht beschrieben ist.

4.1.3. Stabile intraoperative Temperaturkurven

Um die durch die Versuche in Narkose erreichte Temperaturkonstanz der Körperkern-temperatur der Mäuse auch während der ischämischen Reperfusion zu erreichen, bedurfte es weiterer Standardisierungen des Versuchsaufbaus. Dabei ergab sich die Notwendigkeit, verschiedene Einstellungen der Wärmekammer in der präoperativen Phase im Vergleich zur Ischämiezeit zu verwenden. Für die männlichen Mäuse war eine eingestellte Temperatur der Wärmekammer von 37°C präoperativ und 37.8°C während der Ischämiezeit nötig. Damit konnten wir erreichen, dass im Vergleich zum ursprünglichen Versuchsaufbau anstelle von 0.69% der gemessenen Körpertemperaturen jetzt 99.3% der Werte im Zielbereich zwischen 36.5-38.5°C lagen. Unterschiedliche Einstellungen der Wärmekammer benötigten wir auch für die weiblichen Mäuse, welche jünger und leichter waren. Hier waren 37.3°C präoperativ und 38.3°C in der Ischämiezeit notwendig. Dies zeigt, dass für verschiedene Kollektive von Mäusen erneut die Einstellungen zur Erhaltung der Körperkerntemperatur ermittelt werden müssen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dies nur für zwei verschiedene Kollektive gezeigt

werden, für 8.7 Wochen alte, 25 ± 1 g schwere, männliche C57Bl/6N Mäuse und für 6.4 Wochen alte, 18 ± 1 g schwere, weibliche C57Bl/6N Mäuse. Angaben anderer Arbeitsgruppen zu den Geräteeinstellungen ließen sich nicht finden. Beide Kollektive finden häufig Verwendung. Durch die Untersuchung von lediglich zwei Kollektiven ist die Repräsentativität jedoch eingeschränkt. Ziel dieser Arbeit war es jedoch nicht, für jedes Mauskollektiv die richtigen Geräteeinstellungen zu finden, sondern eine Methodik zu entwickeln, welche es ermöglicht, konstante Körperkerntemperaturen während der IR zu erhalten. Erste derzeit laufende Untersuchungen in unserem Labor mit dem in dieser Arbeit entwickelten Versuchsaufbau zeigen, dass auch für weitere Mauskollektive eine gute Temperaturkonstanz mit nur geringen Änderungen der Geräteeinstellungen zu erreichen ist. Somit kann diese Arbeit als Anleitung für weitere nachfolgende Experimente und als Leitfaden zur Einstellung der Temperaturkonstanz der Körperkerntemperatur der Mäuse während der IR dienen.

Weiterhin sollte durch den Versuchsaufbau eine möglichst große zeitliche Effizienz erreicht werden, um möglichst viele Versuche in einem kurzen Zeitraum durchführen zu können. Dadurch soll zum einen die Variabilität durch verschiedene Operateure oder verschiedene Operationstage eines Operateurs reduziert werden, zum anderen sollen tagesabhängige Schwankungen der Raumtemperatur gering gehalten werden. So sollte bestenfalls ein Versuch mit all seinen Untergruppen an einem Tag durch einen Operateur durchzuführen sein. Durch die Verwendung eines Versuchsaufbaus mit Koppelung von Rektalsonde und Wärmeplatte, wie in vielen Arbeitsgruppen beschrieben [115]–[117], ist diese Effizienz nicht zu erreichen, da jeweils nur eine Maus auf der Wärmeplatte platziert werden kann. Nachteil der hier angewendeten Methode ist allerdings, dass bei Temperaturinstabilität einer Maus keine Gegenregulationen durchgeführt werden können, da diese alle Mäuse betreffen würden. Durch die simultane Messung der Körperkerntemperatur würde dies zwar bemerkt und die Maus aus dem Versuch ausgeschlossen werden, diese wäre jedoch für weitere Untersuchungen verloren. Um dies zu verhindern, war eine suffiziente Temperaturstabilisierung aller Mäuse hilfreich, welche durch Standardisierung der präoperativ in der Wärmekammer verbrachten Zeit auf 10 Minuten erreicht werden konnte. So zeigte sich, dass die Temperaturen der Mäuse zu Beginn der operativen Phase homogen und gut kontrolliert waren und so Hypo- oder Hyperthermien im Verlauf vermieden werden konnten.

Im Vergleich zu den vorherigen Experimenten mit geringerer Körperkerntemperatur zeigte sich, wie auch in der Literatur vorbeschrieben, ein schnellerer Abbau der Narkosesubstanzen unter höherer Körperkerntemperatur [85], sodass bei gleicher Ischämiezeit erneute Gaben noch während der Operation notwendig wurden. Da jedoch durch die verbesserte Temperaturkonstanz dieselbe Schädigung bereits nach kürzerer Ischämiezeit erreicht werden konnte, konnten durch eine kürzere Ischämiezeit wiederholte Gaben von Anästhetika und die damit einhergehenden Risiken und Variablen vermieden werden.

Zusammenfassend konnte ein Versuchsaufbau der ischämischen Reperfusion entwickelt werden, der eine konstante Erhaltung der Körperkerntemperatur der Mäuse ermöglicht. Vorteil dieser Arbeit ist das konsequente simultane Messen der Körperkerntemperatur und die dadurch gegebene dauerhafte Kontrolle, die Wärmezufuhr von allen Seiten durch die Wärmekammer und die Entwicklung eines effizienten und standardisierten Versuchsaufbaus zur Erhaltung der Körperkerntemperatur der Mäuse während der IR und somit Verbesserung der Reliabilität der Ergebnisse. Weiterhin vorteilhaft ist die leichte Handhabung der Geräte mit entsprechend einfacher und schneller Übertragbarkeit auf weitere Mauskohorten. Nachteilig ist die bisher nur geringe Anzahl an getesteten Versuchstiergruppen mit daraus resultierender Notwendigkeit, die Geräteeinstellungen vor jedem Versuch neu zu optimieren, sowie die Ausrichtung der Versuche lediglich zur Kontrolle der Temperatur und Ischämiezeit. Zusammenfassend konnte im ersten Teil der Arbeit gezeigt werden, dass eine Stabilisierung der Körperkerntemperatur der Mäuse während der IR möglich ist.

4.2. Einfluss der Temperatur auf das Ausmaß der Schädigung

Die Temperatur als ein wichtiger Einflussfaktor auf die ischämische Schädigung ist wie unten aufgeführt in verschiedenen Organen bekannt. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch eine Stabilisierung bzw. Erhöhung der Körperkerntemperatur der Tiere ein größerer ischämischer Schaden verursacht wird. Dabei zeigte sich histopathologisch eine erhöhte Anzahl an nekrotischen Tubuli. Nach 45 Minuten Ischämiezeit und Temperaturkonstanz waren bei den männlichen Mäusen $92.6 \pm 0.9\%$ der Tubuli im OSOM der Niere nekrotisch. Im Vergleich dazu waren es ohne Temperaturkonstanz und damit unter zwischenzeitlicher Hypothermie $63.2 \pm 3.7\%$ der Tubuli. Eine besser erhaltene tubuläre Morphologie sowie geringere Funktionseinschränkungen der Niere gemessen am Kreatinin

bei der IR durch niedrigere Körpertemperaturen konnten bereits gezeigt werden [118]. Auch die Expression tubulärer Schädigungsmarker wie KIM-1 und NGAL war in unseren Versuchen unter Temperaturkonstanz signifikant erhöht. Gleiches zeigte sich für die Expression entzündlicher Faktoren wie IL-6, CXCL-2 und TNF alpha. Für IL-6 ist in der Literatur ein Anstieg als proentzündlicher Marker bei der ischämischen Reperfusion beschrieben [119], dabei sind die höchsten Werte nach vier bis acht Stunden Reperfusion nachzuweisen. Nicht beobachtet werden konnte ein Verlust der proximalen Tubuli mit Hilfe von Lectin-Färbungen. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der ischämischen Niere. Auch zwischen den Gruppen ischämischer Nieren mit unterschiedlicher Temperatur während der IR zeigte sich kein Unterschied. Allerdings wurden die Färbungen nach 24 Stunden Reperfusion durchgeführt. Möglicherweise ist zu diesem frühen Zeitpunkt noch kein Verlust der Tubuli zu finden, welcher sich noch im Verlauf entwickelt. Auffällig war jedoch bereits eine veränderte Architektur der Lectin-gefärbten Tubuli, welche sich jedoch nicht vergleichend auswerten ließ.

Analog zu unseren Ergebnissen konnten andere Gruppen zeigen, dass bereits eine milde Hypothermie (Minimum von 32°C) der Tiere während der renalen ischämischen Reperfusion einen protektiven, eine milde Hyperthermie (Maximum von 39°C) einen aggravierenden Effekt auf den ischämischen Schaden hat [120]. Dabei nimmt mit geringer Hyperthermie nicht nur das Ausmaß der Schädigung, sondern auch die Letalität zu [118]. Der schädigende Effekt durch Hyperthermie der Tiere, hier definiert als 39.5°C Rektaltemperatur, entsteht dabei vor allem während der Ischämie und nur in abgeschwächter Form während der frühen Reperfusion. Hyperthermie in der späten Reperfusion allein oder ohne Ischämie hat keinen zusätzlichen Effekt auf den Schaden [121]. Analog dazu hat die Hypothermie der Tiere in den verschiedenen Phasen der ischämischen Reperfusion unterschiedliche Effekte. Während der Ischämie zeigte sich ein protektiver Effekt der Hypothermie auf den renalen ischämischen Schaden, während der Reperfusion bis zu 60 Minuten nur ein schwach protektiver Effekt und während der Ischämie und der frühen Reperfusion ein additiv protektiver Effekt. Hypothermie 60 Minuten nach Beginn der Reperfusion hat dabei keinen Effekt mehr auf den Schaden [122]. Die Körperkerntemperatur der Mäuse hat dementsprechend einen großen Effekt auf das Ausmaß der Schädigung durch die ischämische Reperfusion und ist eine wichtige Variable der renalen IR und nach der Dauer der Ischämie wohl der wichtigste Faktor, der das Ausmaß der ischämischen Schädigung beeinflusst [75].

Eine klinische prospektive randomisierte Studie am Menschen, welche den Effekt von systemischer Hypothermie auf das Auftreten postinterventioneller Radiokontrastnephropathie nach Angiographie untersuchte, fand jedoch keinen protektiven Effekt der Hypothermie im Vergleich zu Standardverfahren [123]. Die *Hypothermia Study Group*, welche den neurologischen Effekt von milder Hypothermie nach kardiopulmonaler Reanimation untersucht [90], hat in einer Teilstudie den Effekt auf die renale Funktion untersucht und auch hier zeigte sich kein Unterschied in der Häufigkeit des akuten Nierenversagens oder des Einsatzes von Nierenersatzverfahren [124]. Zwei weitere randomisierte klinische Studien untersuchten den Effekt von milder Hypothermie für 24 Stunden und sukzessivem Aufwärmen nach koronarer Bypass-Chirurgie. In der einen Studie wurden die Patienten während der Bypass-Chirurgie auf 32°C gekühlt und dann entweder auf 34°C oder 37°C erwärmt. Es zeigten sich höhere Kreatininwerte in der auf 37°C erwärmten Gruppe. In der zweiten Studie wurden die Patienten entweder auf 34°C gekühlt, oder bei 37°C normotherm gehalten. Es zeigte sich kein Unterschied der renalen Funktion, sodass die Autoren schlussfolgern, dass eine milde Hypothermie während der Bypass-Chirurgie die renale Funktion nicht beeinflusst, das Aufwärmen jedoch ein Risiko birgt und vermieden werden sollte [125]. Diesbezüglich wird in der Literatur jedoch kritisiert, dass das Erwärmen der Patienten als eigener Risikofaktor der renalen Schädigung bekannt und zur Evaluation der renalen Schädigung nach Hypothermie daher nicht geeignet ist. Anstelle dessen sollte eine postoperative Fortführung der Hypothermie durchgeführt werden und der Patient erst im Verlauf langsam erwärmt werden [126]. Zusammenfassend muss festgehalten werden, dass die aktuelle Studienlage uneinheitlich ist. Ein protektiver Effekt der Hypothermie konnte vor allem in Tierversuchen nachgewiesen werden, am Menschen ist die Datenlage widersprüchlich und bedarf weiterer Untersuchungen. Aktuell rekrutiert eine große randomisiert kontrollierte Studie (POLAR, Prophylactic HypOthermia to Lessen trAumatic brain injuRy) [127] in Australien und Neuseeland Patienten mit schwerem Schädel-Hirn-Trauma zur Hypothermie (33°C) für ≥ 72 Stunden oder zur Normothermie (36.5 – 37.5°C). Primärer Endpunkt ist dabei der neurologische Schaden, es wird jedoch auch eine Teilstudie untersucht, die POLAR-AKI, welche den Effekt der Hypothermie auf die Entstehung des akuten Nierenversagens untersucht. Dies wäre dann die größte bisher durchgeführte randomisierte kontrollierte Studie, welche den Effekt von systemischer Hypothermie auf die renale Funktion untersucht und durch die große Fallzahl die Wahrscheinlichkeit erhöht, einen therapeutischen Effekt der systemischen Hypothermie zu detektieren.

Die selektive Hypothermie der Niere hingegen wird in der Urologie bereits therapeutisch genutzt, um durch Reduzierung des renalen Metabolismus die Dauer der Ischämietoleranz der Niere zu verlängern. So kann es bei nierenerhaltenden Operationen zur Blutstillung notwendig sein, die renale Blutversorgung vollständig zu unterbinden. Zur Abminderung der dadurch entstehenden renalen Schädigung und zur Verlängerung der Ischämiezeit, welche keine wesentliche funktionelle Einschränkungen mit sich bringt, wird die Niere intraoperativ gekühlt [128]–[130]. Dabei wird die Niere bei offenen Verfahren mit Eisbeuteln umgeben, doch auch in der laparoskopischen Chirurgie gibt es mittlerweile verschiedene Methoden, die Niere zu kühlen [131], [132].

In der urologischen Chirurgie ist die Hypothermie der Niere als prophylaktisches wie therapeutisches Verfahren bereits im Einsatz. Dass im Gegensatz zur systemischen Hypothermie ein protektiver Effekt der lokalen Hypothermie der Niere auf die ischämische Schädigung gezeigt werden konnte, könnte im Aufbau der Studien begründet liegen. Die lokale Hypothermie in den oben genannten Studien wird direkt nach Beginn der Ischämie begonnen. Dies geschieht in den oben beschriebenen Studien zur systemischen Hypothermie später, da der Beginn der Ischämie zum Beispiel bei kardiopulmonaler Reanimation nicht vorherzusehen ist. Der spätere Beginn der Hypothermie könnte ursächlich für den zum Teil fehlenden Effekt der systemischen Hypothermie sein, da wie oben beschrieben Zager et al. im Tierversuch zeigen konnten, dass Hypothermie nur während der Ischämie und bis 60 Minuten danach einen protektiven Effekt hat [122].

Der Einfluss der Temperatur auf experimentelle ischämische Schäden ist nicht nur für die Niere, sondern auch für andere Organe beschrieben. So zeigte sich, dass Hyperthermie im Tiermodell des zerebralen ischämischen Insultes sowohl die Fläche der ischämischen Schädigung, als auch die funktionellen Defizite vergrößert und die Mortalität erhöht [133]. Hypothermie hingegen verringert den ischämischen Schaden [134]. Auch bei der kardialen Ischämie nimmt die Fläche des durch einen ischämischen Infarkt geschädigten Areals bei Hypothermie ab [135]. Weiter konnte gezeigt werden, dass ohne äußere Temperaturregulation die Körperkerntemperatur der Mäuse nach der operativen zerebralen Ischämieinduktion abfällt und so den ischämischen Schaden abschwächt [136]. Hypothermie wird bei zerebraler Hypoxie als therapeutisches Konzept mittlerweile nicht nur in Tierversuchen verwendet, sondern ist ein klinisches Standardverfahren. So zeigte sich, dass bei Patienten mit zerebraler ischämischer Schädigung nach Herzstillstand und Reanimation

milde therapeutische Hypothermie um 33°C die Mortalität senkt und das neurologische Defizit verringert [90], [126], [137]. Auch bei einem weiteren Patientenkollektiv mit zerebraler Hypoxie, der perinatalen Asphyxie der Neugeborenen, ist die Hypothermie als therapeutisches Konzept etabliert. Dabei reduziert Ganzkörper-Hypothermie das Risiko zu versterben oder unter einer späteren Behinderung zu leiden [138], [139]. Tierexperimentell konnte dabei gezeigt werden, dass Hypothermie die Aktin-Modifizierungen in den dendritischen Fortsätzen reduziert und so den Untergang der Neurone verhindert [140].

Zusammenfassend deckt sich die in dieser Arbeit gezeigte Relevanz der Temperatur als ein Einflussfaktor auf ischämische Schädigungen mit den vorhandenen Daten in verschiedenen Organen sowohl bei Menschen als auch im Tiermodell. Es zeigt sich in den meisten Studien ein protektiver Effekt der Hypothermie auf die ischämische Schädigung. Möglicherweise liegt in der Hypothermie eine zukünftige therapeutische Option beim akuten Nierenversagen. Für experimentelle Untersuchungen mit dem Modell der ischämischen Reperfusion ist es wichtig, dass die Temperatur simultan gemessen und kontrolliert wird, um einen geeigneten ischämischen Stimulus zu garantieren und adäquate Vergleiche zwischen verschiedenen therapeutischen Interventionen zu ermöglichen.

4.3. Einfluss der Dauer der Ischämie auf das Ausmaß der Schädigung

In dieser Arbeit ebenfalls untersucht wurde der Effekt variabler Ischämiezeiten während der ischämischen Reperfusion der Niere nach Etablierung einer Methodik zur konstanten Erhaltung der Körperkerntemperatur der Mäuse. Es konnte gezeigt werden, dass bei den untersuchten Ischämiezeiten mit der Dauer der Ischämiezeit auch das Ausmaß der Schädigung zunahm. Dabei lag die Körperkerntemperatur aller Tiere konstant im Zielbereich. Das Ausmaß der Schädigung wurde anhand der Expression tubulärer Schädigungsmarker und proentzündlicher Faktoren sowie der histologischen Schädigung anhand des prozentualen Anteils von nekrotischen Tubuli an allen Tubuli im OSOM bewertet.

Die Abhängigkeit der ischämischen Schädigung von der Dauer der Ischämiezeit ist kein neues Konzept. Die fast proportionale Beziehung von Ischämiezeit und ischämischer Schädigung bei konstanter Körperkerntemperatur weist jedoch auf eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hin, da weitere Einflussfaktoren von geringerer Relevanz zu sein scheinen.

So konnten andere Gruppen zeigen, dass die Länge der Ischämiezeit in einem bestimmten Bereich das Ausmaß des ischämischen Schadens im akuten Nierenversagen bestimmt. Besonders aus der Urologie gibt es viele Untersuchungen zur Dauer der Ischämiezeit und den Folgen auf die renale Funktion, da intraoperativ zur Blutstillung häufig die renale Blutversorgung abgeklemmt werden muss. Dies gilt vor allem für Ischämiezeiten zwischen 30 Minuten und 90 Minuten im Schweine-Modell [132]. In dieser Arbeit wurden nur Messungen nach 24 Stunden Reperfusion durchgeführt. Dabei wurden das histologische Schädigungsausmaß und die veränderten Expressionsraten tubulärer Schädigungsmarker und proentzündlicher Faktoren nach 15, 25, 35 oder 45minütiger Ischämie bestimmt. Funktionelle Daten gibt es in dieser Arbeit aufgrund der unilateralen Ischämie nicht. Analog zu den Daten in der Literatur konnte auch diese Arbeit zeigen, dass mit der Dauer der Ischämiezeit mit den untersuchten Ischämiezeiten das Ausmaß der akuten Schädigung zunimmt. Weder die Langzeiteffekte noch die funktionellen Auswirkungen auf die GFR wurden in dieser Arbeit untersucht. Ziel oben beschriebener urologischer Studien war es, eine „sichere“ Ischämiezeit zu definieren, die zu einer Normalisierung von Kreatinin-Wert oder GFR nach zwei Wochen führte und so anscheinend keinen bleibenden Funktionsverlust induzierte. Kritisch angemerkt werden muss jedoch, dass der Kreatininwert ein schlechter Indikator für eine normale renale Funktion ist. So wird der Kreatinin-blinde Bereich außer Acht gelassen und die regenerative Kapazität der Niere eventuell überschätzt. Wie groß der dauerhafte Nephronenverlust und die daraus entstehende Langzeitfolgen für die Nierenfunktion sind, wurde bisher in diesem Zusammenhang nicht untersucht.

In den letzten Jahren stieg das Interesse an den Langzeitfolgen der akuten Nierenschädigung und neuere Untersuchungen konnten die akute Nierenschädigung als einen wichtigen Risikofaktor der Entwicklung einer chronischen Nierenerkrankung mit hoher Morbidität und Mortalität zeigen [141]. Die akute Nierenschädigung ist, wie bereits in der Einleitung beschrieben, schon jetzt ein in Häufigkeit und Schwere relevantes Krankheitsbild. In einer alternden Gesellschaft mit immer besserer intensivmedizinischer Versorgung wird die Anzahl überlebter akuter Nierenschädigungen genauso wie die Anzahl multimorbider Patienten mit erhöhtem Risiko für eine akute Nierenschädigung zunehmen und folglich auch die Anzahl chronischer Nierenerkrankungen nach akuter Nierenschädigung. Daher ist die Suche nach einer zielgerichteten Therapie der akuten Nierenschädigung eine der großen Herausforderungen der aktuellen medizinischen Forschung. Für dieses Ziel dient die

ischämische Reperfusion als ein vielgenutztes Modell. So liegt der Stellenwert dieser Arbeit in der Verbesserung eines Modells der akuten Nierenschädigung und Steigerung der Reliabilität der dadurch generierten Daten durch Verringerung eines der wichtigsten Einflussfaktoren auf die ischämische Reperfusion.

Dennoch ist die ischämische Reperfusion als tierexperimentelles Modell für die akute Nierenschädigung umstritten. So scheint die akute Nierenschädigung bei der IR der Maus hauptsächlich auf der histologischen akuten Tubulusnekrose zu basieren. Im Menschen gibt es weniger systematische Biopsien während der akuten Phase der Nierenschädigung, doch scheint der Schaden im Gegensatz zu dem bei Mäusen ein distal betonter Tubulusschaden zu sein und eine generelle ausgedehnte Tubulusnekrose tritt nicht auf [142]. Geringere Schädigungen mit milder und fokaler tubulärer Schädigung wie beim Menschen korrelieren häufig nicht mit der funktionellen Einschränkung. Die Realisierung von Modellen, welche Prädispositionsfaktoren miteinschließen, ist daher ein wichtiger Prozess, um dem klinischen Bild der akuten Nierenschädigung besser gerecht zu werden und durch geringere Schädigungen gleichwertige Schäden zu erreichen.

Unglücklicherweise konnte bisher für keine Intervention, welche sich im Tiermodelle als effektiv gezeigt hatte, ein Therapievorteil am Menschen nachgewiesen werden [66]. Die Unterschiede zwischen Mensch und Tier machen Vergleiche schwierig und Rückschlüsse auf die pathologischen Grundlagen können nicht direkt gezogen werden.

Eine komplette warme renale Ischämie wie im Modell der IR ist im Menschen eher selten, meist kommt es lediglich zu einer Reduktion der renalen Durchblutung mit geringen strukturellen Veränderungen, aber starken Einschränkungen der funktionellen Fähigkeit der Niere. Zur akuten Tubulusnekrose wie im Modell der murinen IR kommt es in seltenen Fällen wie dem protrahierten Kreislaufschock. Im klinischen Alltag sind die Patienten häufig multimorbide und haben weitere Risikofaktoren oder eine vorbestehende Nierenfunktionsstörung, sodass bereits geringere ischämische Schädigungen eine akute Nierenschädigung auslösen. Im Gegensatz dazu werden in den Tiermodellen der akuten Nierenschädigung meist junge und sonst gesunde Tiere benutzt, denen eine ausgeprägte ischämische Schädigung zugefügt wird, welche zum Vollbild der akuten Tubulusnekrose führt. Das Modell der IR ist gerade in der Maus besonders variabel, da aufgrund der geringen Größe des Tieres und der vergleichsweise großen Körperoberfläche äußere Einflüsse wie zum Beispiel die

Außentemperatur schneller zu Temperaturveränderungen der Niere führen. Dennoch ist das murine Modell eines der am Häufigsten benutzten, da durch die große Anzahl an transgenen Mäusen verschiedene Fragestellungen untersucht werden können. Trotz all der obigen Kritikpunkte hat die murine IR auch aus Ermangelung besserer Modelle der akuten Nierenschädigung dennoch einen hohen Stellenwert in der aktuellen Forschung. Die Verbesserung der Temperaturkonstanz und damit die verbesserte Reliabilität der Ergebnisse sind zur Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Versuche unerlässlich und sollten Basis jeder Versuchsreihe sein. Mit dieser Arbeit konnte ein Versuchsaufbau etabliert werden, der es ermöglicht, in unterschiedlichen Versuchen mit wenig Aufwand und hoher Effektivität optimale Versuchsbedingungen zu schaffen.

4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick

In dieser Arbeit konnte die Möglichkeit der Erhaltung der Körperkerntemperatur der Mäuse während der ischämischen Reperfusion gezeigt werden. Dabei wurde erstmalig eine Wärmekammer verwendet, welche Wärmezufuhr von allen Seiten ermöglicht und unabhängig von der Außentemperatur ist. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass ein wichtiger Teil der Temperaturerhaltung die präoperative Wärmezufuhr ist.

Einen Stellenwert erlangt die Arbeit jedoch auch durch die Standardisierung der Methodik der ischämischen Reperfusion und die dadurch gegebene Vergleichbarkeit und Verlässlichkeit der Ergebnisse.

Es konnte gezeigt werden, dass Hypothermie während der Ischämie einen protektiven Effekt auf das Ausmaß der Schädigung hat. Dies wird in der Urologie bereits therapeutisch genutzt und weitere Forschung ist nötig, um einen möglichen Einsatz von therapeutischer Hypothermie bei der akuten Nierenschädigung zu evaluieren.

Literaturverzeichnis

- [1] R. R. Bueters, N. C. van de Kar, and M. F. Schreuder, "Adult renal size is not a suitable marker for nephron numbers: an individual patient data meta-analysis.," *Kidney Blood Press. Res.*, vol. 37, no. 6, pp. 540–6, Jan. 2013.
- [2] S. Silbernagl, "Renal transport of amino acids.," *Klin. Wochenschr.*, vol. 57, no. 19, pp. 1009–19, Oct. 1979.
- [3] D. Raciti, L. Reggiani, L. Geffers, Q. Jiang, F. Bacchion, A. E. Subrizi, D. Clements, C. Tindal, D. R. Davidson, B. Kaissling, and A. W. Brändli, "Organization of the pronephric kidney revealed by large-scale gene expression mapping.," *Genome Biol.*, vol. 9, no. 5, p. R84, Jan. 2008.
- [4] R. Bellomo, C. Ronco, J. a Kellum, R. L. Mehta, and P. Palevsky, "Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group.," *Crit. Care*, vol. 8, no. 4, pp. R204–12, Aug. 2004.
- [5] R. L. Mehta, J. a Kellum, S. V Shah, B. a Molitoris, C. Ronco, D. G. Warnock, and A. Levin, "Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury.," *Crit. Care*, vol. 11, no. 2, p. R31, Jan. 2007.
- [6] K. D. I. G. O. (KDIGO) A. K. I. W. Group, "KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury.," in *Kidney Int Suppl*, 2012, vol. 2, no. 1, pp. 1–138.
- [7] D. Fliser, M. Laville, A. Covic, D. Fouque, R. Vanholder, L. Juillard, and W. Van Biesen, "A European Renal Best Practice (ERBP) position statement on the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) clinical practice guidelines on acute kidney injury: part 1: definitions, conservative management and contrast-induced nephropathy.," *Nephrol. Dial. Transplant*, vol. 27, no. 12, pp. 4263–72, Dec. 2012.
- [8] P. M. Palevsky, K. D. Liu, P. D. Brophy, L. S. Chawla, C. R. Parikh, C. V Thakar, A. J. Tolwani, S. S. Waikar, and S. D. Weisbord, "KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury.," *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 61, no. 5, pp. 649–72, May 2013.
- [9] N. Lameire, W. Van Biesen, and R. Vanholder, "Acute renal failure.," *Lancet*, vol. 365, no. 9457, pp. 417–30, 2005.
- [10] J. Cerdá, N. Lameire, P. Eggers, N. Pannu, S. Uchino, H. Wang, A. Bagga, and A. Levin, "Epidemiology of acute kidney injury.," *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 3, no. 3, pp. 881–6, May 2008.

-
- [11] S. Uchino, J. A. Kellum, R. Bellomo, G. S. Doig, H. Morimatsu, S. Morgera, M. Schetz, I. Tan, C. Bouman, E. Macedo, N. Gibney, A. Tolwani, and C. Ronco, "Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study.," *JAMA*, vol. 294, no. 7, pp. 813–8, Aug. 2005.
- [12] P. Susantitaphong, D. N. Cruz, J. Cerda, M. Abulfaraj, F. Alqahtani, I. Koulouridis, and B. L. Jaber, "World incidence of AKI: a meta-analysis.," *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 8, no. 9, pp. 1482–93, Sep. 2013.
- [13] E. a J. Hoste, G. Clermont, A. Kersten, R. Venkataraman, D. C. Angus, D. De Bacquer, and J. a Kellum, "RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis.," *Crit. Care*, vol. 10, no. 3, p. R73, Jan. 2006.
- [14] S. Uchino, R. Bellomo, D. Goldsmith, S. Bates, and C. Ronco, "An assessment of the RIFLE criteria for acute renal failure in hospitalized patients.," *Crit. Care Med.*, vol. 34, no. 7, pp. 1913–7, Jul. 2006.
- [15] J. Kaufman, M. Dhakal, B. Patel, and R. Hamburger, "Community-acquired acute renal failure.," *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 17, no. 2, pp. 191–8, Feb. 1991.
- [16] B. K. Novis, M. F. Roizen, S. Aronson, and R. a Thisted, "Association of preoperative risk factors with postoperative acute renal failure.," *Anesth. Analg.*, vol. 78, no. 1, pp. 143–9, Jan. 1994.
- [17] M. H. Rosner, "Acute kidney injury in the elderly.," *Clin. Geriatr. Med.*, vol. 29, no. 3, pp. 565–78, Aug. 2013.
- [18] R. Thadhani, M. Pascual, and J. V Bonventre, "Acute renal failure.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 334, no. 22, pp. 1448–60, May 1996.
- [19] C.-Y. Hsu, C. E. McCulloch, D. Fan, J. D. Ordoñez, G. M. Chertow, and A. S. Go, "Community-based incidence of acute renal failure.," *Kidney Int.*, vol. 72, no. 2, pp. 208–12, Jul. 2007.
- [20] R. L. Mehta, M. T. Pascual, S. Soroko, B. R. Savage, J. Himmelfarb, T. A. Ikizler, E. P. Paganini, and G. M. Chertow, "Spectrum of acute renal failure in the intensive care unit: the PICARD experience.," *Kidney Int.*, vol. 66, no. 4, pp. 1613–21, Oct. 2004.
- [21] R. K. Hsu, C. E. McCulloch, R. A. Dudley, L. J. Lo, and C. Hsu, "Temporal Changes in Incidence of Dialysis-Requiring AKI," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 24, no. 1, pp. 37–42, 2013.
- [22] H. Schiff, "Renal recovery from acute tubular necrosis requiring renal replacement therapy: a prospective study in critically ill patients.," *Nephrol. Dial. Transplant*, vol. 21, no. 5, pp. 1248–52, May 2006.

- [23] A. Ishani, J. L. Xue, J. Himmelfarb, P. W. Eggers, P. L. Kimmel, B. a Molitoris, and A. J. Collins, "Acute kidney injury increases risk of ESRD among elderly.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 20, no. 1, pp. 223–8, Jan. 2009.
- [24] R. Wald, R. R. Quinn, J. Luo, P. Li, D. C. Scales, M. M. Mamdani, and J. G. Ray, "Chronic dialysis and death among survivors of acute kidney injury requiring dialysis.," *JAMA*, vol. 302, no. 11, pp. 1179–85, Sep. 2009.
- [25] L. J. Lo, A. S. Go, G. M. Chertow, C. E. McCulloch, D. Fan, J. D. Ordoñez, and C. Hsu, "Dialysis-requiring acute renal failure increases the risk of progressive chronic kidney disease.," *Kidney Int.*, vol. 76, no. 8, pp. 893–9, Oct. 2009.
- [26] G. M. Chertow, E. Burdick, M. Honour, J. V Bonventre, and D. W. Bates, "Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 16, no. 11, pp. 3365–70, Nov. 2005.
- [27] B. Rose, *Pathophysiology of Renal Disease*, 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 1987.
- [28] F. Lio, J. Pascual, T. H. E. Madrid, A. Renal, and F. Study, "Epidemiology of acute renal failure : A prospective , multicenter , community-based study," vol. 50, pp. 811–818, 1996.
- [29] G. Piecha, A. Wiecek, and A. Januszewicz, "Epidemiology and optimal management in patients with renal artery stenosis.," *J. Nephrol.*, vol. 25, no. 6, pp. 872–8, 2012.
- [30] S. J. Hwang, M. Haas, H. W. Harris, P. Silva, S. Yalla, M. R. Sullivan, G. Otuechere, M. Kashgarian, and M. L. Zeidel, "Transport defects of rabbit medullary thick ascending limb cells in obstructive nephropathy.," *J. Clin. Invest.*, vol. 91, no. 1, pp. 21–8, Jan. 1993.
- [31] W. T. Councilman, "ACUTE INTERSTITIAL NEPHRITIS.," *J. Exp. Med.*, vol. 3, no. 4–5, pp. 393–420, Jul. 1898.
- [32] M. Praga and E. González, "Acute interstitial nephritis.," *Kidney Int.*, vol. 77, no. 11, pp. 956–61, Jun. 2010.
- [33] C. R. Nolan and R. J. Anderson, "Hospital-acquired acute renal failure.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 9, no. 4, pp. 710–8, Apr. 1998.
- [34] C.-W. Cheng, S.-M. Ka, S.-M. Yang, H.-A. Shui, Y.-W. Hung, P.-C. Ho, Y.-C. Su, and A. Chen, "Nephronectin expression in nephrotoxic acute tubular necrosis.," *Nephrol. Dial. Transplant*, vol. 23, no. 1, pp. 101–9, Jan. 2008.
- [35] W. Lieberthal and S. K. Nigam, "Acute renal failure. I. Relative importance of proximal vs. distal tubular injury.," *Am. J. Physiol.*, vol. 275, no. 5 Pt 2, pp. F623–31, Nov. 1998.
- [36] B. a Molitoris, R. Dahl, and a Geerdes, "Cytoskeleton disruption and apical redistribution of proximal tubule Na(+)-K(+)-ATPase during ischemia.," *Am. J. Physiol.*, vol. 263, no. 3 Pt 2, pp. F488–95, Sep. 1992.

- [37] J. F. Donohoe, M. a Venkatachalam, D. B. Bernard, and N. G. Levinsky, "Tubular leakage and obstruction after renal ischemia: structural-functional correlations.," *Kidney Int.*, vol. 13, no. 3, pp. 208–22, Mar. 1978.
- [38] L. C. Racusen, "Epithelial cell shedding in acute renal injury.," *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, vol. 25, no. 3–4, pp. 273–5, 1998.
- [39] J. Mason, T. Takabatake, C. Olbricht, and K. Thurau, "The early phase of experimental acute renal failure. III. Tubuloglomerular feedback.," *Pflugers Arch.*, vol. 373, no. 1, pp. 69–76, Jan. 1978.
- [40] J. V Bonventre and a Zuk, "Ischemic acute renal failure : An in fl ammatory disease ?, " *Kidney Int.*, vol. 66, pp. 480–485, 2004.
- [41] B. a Molitoris and T. a Sutton, "Endothelial injury and dysfunction: role in the extension phase of acute renal failure.," *Kidney Int.*, vol. 66, no. 2, pp. 496–9, Aug. 2004.
- [42] S. V Brodsky, T. Yamamoto, T. Tada, B. Kim, J. Chen, F. Kajiya, and M. S. Goligorsky, "Endothelial dysfunction in ischemic acute renal failure: rescue by transplanted endothelial cells.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 282, no. 6, pp. F1140–9, Jun. 2002.
- [43] J. V Bonventre and L. Yang, "Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury.," *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no. 11, pp. 4210–21, Nov. 2011.
- [44] K. L. Rock, E. Latz, F. Ontiveros, and H. Kono, "The sterile inflammatory response.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 28, pp. 321–42, Jan. 2010.
- [45] M. Lech, R. Gröbmayer, M. Ryu, G. Lorenz, I. Hartter, S. R. Mulay, H. E. Susanti, K. S. Kobayashi, R. a Flavell, and H.-J. Anders, "Macrophage Phenotype Controls Long-Term AKI Outcomes--Kidney Regeneration versus Atrophy.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, pp. 1–13, Dec. 2013.
- [46] D. A. Ferenbach and J. V Bonventre, "Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD," *Nat. Publ. Gr.*, 2015.
- [47] F. Syed, A. Mena-Gutierrez, and U. Ghaffar, "A Case of Iced-Tea Nephropathy," *N. Engl. J. Med.*, vol. 372, no. 14, pp. 1377–1378, 2015.
- [48] H. Servais, Y. Jossin, F. Van Bambeke, P. M. Tulkens, and M.-P. Mingeot-Leclercq, "Gentamicin causes apoptosis at low concentrations in renal LLC-PK1 cells subjected to electroporation.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 50, no. 4, pp. 1213–21, Apr. 2006.
- [49] R. Safirstein, P. Miller, and J. B. Guttenplan, "Uptake and metabolism of cisplatin by rat kidney.," *Kidney Int.*, vol. 25, no. 5, pp. 753–8, May 1984.

- [50] S. N. Heyman, C. Rosenberger, and S. Rosen, "Regional alterations in renal haemodynamics and oxygenation: a role in contrast medium-induced nephropathy.," *Nephrol. Dial. Transplant*, vol. 20 Suppl 1, pp. i6–11, Feb. 2005.
- [51] H. Izzedine, V. Launay-Vacher, and G. Deray, "Antiviral drug-induced nephrotoxicity.," *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 45, no. 5, pp. 804–17, May 2005.
- [52] N. N. Lam, M. a Weir, Z. Yao, P. G. Blake, M. M. Beyea, T. Gomes, S. Gandhi, M. Mamdani, R. Wald, C. R. Parikh, D. G. Hackam, and A. X. Garg, "Risk of acute kidney injury from oral acyclovir: a population-based study.," *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 61, no. 5, pp. 723–9, May 2013.
- [53] S. Holt and K. Moore, "Pathogenesis of renal failure in rhabdomyolysis: the role of myoglobin.," *Exp. Nephrol.*, vol. 8, no. 2, pp. 72–6, 2000.
- [54] G. Melli, V. Chaudhry, and D. R. Cornblath, "Rhabdomyolysis: an evaluation of 475 hospitalized patients.," *Medicine (Baltimore)*, vol. 84, no. 6, pp. 377–85, Nov. 2005.
- [55] P. W. Sanders, B. B. Booker, J. B. Bishop, and H. C. Cheung, "Mechanisms of intranephronal proteinaceous cast formation by low molecular weight proteins.," *J. Clin. Invest.*, vol. 85, no. 2, pp. 570–6, Feb. 1990.
- [56] Z. Q. Huang and P. W. Sanders, "Localization of a single binding site for immunoglobulin light chains on human Tamm-Horsfall glycoprotein.," *J. Clin. Invest.*, vol. 99, no. 4, pp. 732–6, Feb. 1997.
- [57] W.-Z. Ying, P.-X. Wang, K. J. Aaron, K. Basnayake, and P. W. Sanders, "Immunoglobulin light chains activate nuclear factor- κ B in renal epithelial cells through a Src-dependent mechanism.," *Blood*, vol. 117, no. 4, pp. 1301–7, Jan. 2011.
- [58] P. W. Sanders, G. A. Herrera, A. Chen, B. B. Booker, and J. H. Galla, "Differential nephrotoxicity of low molecular weight proteins including Bence Jones proteins in the perfused rat nephron in vivo.," *J. Clin. Invest.*, vol. 82, no. 6, pp. 2086–96, Dec. 1988.
- [59] H. Anders, "Immune system modulation of kidney regeneration--mechanisms and implications.," *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 10, no. 6, pp. 347–58, Jun. 2014.
- [60] S. N. Heyman, W. Lieberthal, P. Rogiers, and J. V Bonventre, "Animal models of acute tubular necrosis.," *Curr. Opin. Crit. Care*, vol. 8, no. 6, pp. 526–34, Dec. 2002.
- [61] Y. Qin, M. C. Alderliesten, G. Stokman, P. Pennekamp, J. V. Bonventre, E. de Heer, T. Ichimura, M. de Graauw, L. S. Price, and B. van de Water, "Focal Adhesion Kinase Signaling Mediates Acute Renal Injury Induced by Ischemia/Reperfusion.," *Am. J. Pathol.*, vol. 179, no. 6, pp. 2766–2778, 2011.
- [62] S. Lee, S. Huen, H. Nishio, S. Nishio, H. K. Lee, B.-S. Choi, C. Ruhrberg, and L. G. Cantley, "Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 22, no. 2, pp. 317–326, 2011.

- [63] N. Huang, L. Tan, Z. Xue, J. Cang, and H. Wang, "Reduction of DNA hydroxymethylation in the mouse kidney insulted by ischemia reperfusion," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 422, no. 4, pp. 697–702, 2012.
- [64] D. a Ferenbach, T. a Sheldrake, K. Dhaliwal, T. M. J. Kipari, L. P. Marson, D. C. Kluth, and J. Hughes, "Macrophage/monocyte depletion by clodronate, but not diphtheria toxin, improves renal ischemia/reperfusion injury in mice," *Kidney Int.*, vol. 82, no. 8, pp. 928–933, 2012.
- [65] S. E. Kennedy and J. H. Erlich, "Murine renal ischaemia-reperfusion injury.," *Nephrology (Carlton)*, vol. 13, no. 5, pp. 390–396, Oct. 2008.
- [66] S. N. Heyman, C. Rosenberger, and S. Rosen, "Experimental ischemia-reperfusion: biases and myths-the proximal vs. distal hypoxic tubular injury debate revisited.," *Kidney Int.*, vol. 77, no. 1, pp. 9–16, Jan. 2010.
- [67] D. R. Taft, "The isolated perfused rat kidney model: a useful tool for drug discovery and development.," *Curr. Drug Discov. Technol.*, vol. 1, no. 1, pp. 97–111, Jan. 2004.
- [68] S. N. Heyman, J. Reichman, and M. Brezis, "Pathophysiology of radiocontrast nephropathy: a role for medullary hypoxia.," *Invest. Radiol.*, vol. 34, no. 11, pp. 685–91, Nov. 1999.
- [69] J. M. Weinstein, S. Heyman, and M. Brezis, "Potential deleterious effect of furosemide in radiocontrast nephropathy.," *Nephron*, vol. 62, no. 4, pp. 413–5, Jan. 1992.
- [70] H. D. Humes, M. Sastrasinh, and J. M. Weinberg, "Calcium is a competitive inhibitor of gentamicin-renal membrane binding interactions and dietary calcium supplementation protects against gentamicin nephrotoxicity," *J. Clin. Invest.*, vol. 73, no. 1, pp. 134–147, 1984.
- [71] I. Arany and R. L. Safirstein, "Cisplatin nephrotoxicity," *Semin. Nephrol.*, vol. 23, no. 5, pp. 460–464, 2003.
- [72] M. Newaz, Z. Yousefipour, and A. Oyekan, "Role of PPAR-gamma on the pathogenesis and vascular changes in glycerol-induced acute renal failure.," *Pharmacol. Res.*, vol. 54, no. 3, pp. 234–40, Sep. 2006.
- [73] Q.-H. Yang, D.-W. Liu, Y. Long, H.-Z. Liu, W.-Z. Chai, and X.-T. Wang, "Acute renal failure during sepsis: potential role of cell cycle regulation.," *J. Infect.*, vol. 58, no. 6, pp. 459–464, 2009.
- [74] H. Ruetten, C. Thiemermann, and J. R. Vane, "Effects of the endothelin receptor antagonist, SB 209670, on circulatory failure and organ injury in endotoxic shock in the anaesthetized rat.," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 118, no. 1, pp. 198–204, 1996.
- [75] Q. Wei and Z. Dong, "Mouse model of ischemic acute kidney injury: Technical notes and tricks," *AJP Ren. Physiol.*, vol. 303, no. 11, pp. F1487–94, Dec. 2012.

- [76] D. K. Taylor, "Study of two devices used to maintain normothermia in rats and mice during general anesthesia.," *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, vol. 46, no. 5, pp. 37–41, Sep. 2007.
- [77] R. H. Morris, "Operating room temperature and the anesthetized, paralyzed patient.," *Arch. Surg.*, vol. 102, no. 2, pp. 95–7, Mar. 1971.
- [78] J. M. Frey, M. Janson, M. Svanfeldt, P. K. Svenarud, and J. a van der Linden, "Local insufflation of warm humidified CO₂ increases open wound and core temperature during open colon surgery: a randomized clinical trial.," *Anesth. Analg.*, vol. 115, no. 5, pp. 1204–11, Nov. 2012.
- [79] D. I. Sessler, "Temperature monitoring and perioperative thermoregulation.," *Anesthesiology*, vol. 109, no. 2, pp. 318–38, Aug. 2008.
- [80] D. I. Sessler, C. I. Olofsson, and E. H. Rubinstein, "The thermoregulatory threshold in humans during nitrous oxide-fentanyl anesthesia.," *Anesthesiology*, vol. 69, no. 3, pp. 357–64, Sep. 1988.
- [81] R. Scherer, "[Intraoperative heat conservation. A lot of hot air?].," *Anaesthetist*, vol. 46, no. 2, pp. 81–90, Mar. 1997.
- [82] D. I. Sessler, "Perianesthetic thermoregulation and heat balance in humans.," *FASEB J.*, vol. 7, no. 8, pp. 638–44, May 1993.
- [83] B. Just, E. Delva, Y. Camus, and A. Lienhart, "Oxygen uptake during recovery following naloxone. Relationship with intraoperative heat loss.," *Anesthesiology*, vol. 76, no. 1, pp. 60–4, Jan. 1992.
- [84] C. R. Valeri, H. Feingold, G. Cassidy, G. Ragno, S. Khuri, and M. D. Altschule, "Hypothermia-induced reversible platelet dysfunction.," *Ann. Surg.*, vol. 205, no. 2, pp. 175–81, Mar. 1987.
- [85] T. Heier, J. E. Caldwell, D. I. Sessler, and R. D. Miller, "Mild intraoperative hypothermia increases duration of action and spontaneous recovery of vecuronium blockade during nitrous oxide-isoflurane anesthesia in humans.," *Anesthesiology*, vol. 74, no. 5, pp. 815–9, May 1991.
- [86] R. G. Bickford and F. R. Winton, "The influence of temperature on the isolated kidney of the dog.," *J. Physiol.*, vol. 89, no. 2, pp. 198–219, Mar. 1937.
- [87] C. Y. Lee and M. J. Mangino, "Preservation methods for kidney and liver.," *Organogenesis*, vol. 5, no. 3, pp. 105–12, Jul. 2009.
- [88] R. Y. CALNE, D. E. PEGG, J. PRYSE-DAVIES, and F. L. BROWN, "RENAL PRESERVATION BY ICE-COOLING: AN EXPERIMENTAL STUDY RELATING TO KIDNEY TRANSPLANTATION FROM CADAVERS.," *Br. Med. J.*, vol. 2, no. 5358, pp. 651–5, Sep. 1963.

- [89] G. M. Collins, M. Bravo-Shugarman, and P. I. Terasaki, "Kidney preservation for transportation. Initial perfusion and 30 hours' ice storage.," *Lancet*, vol. 2, no. 7632, pp. 1219–22, Dec. 1969.
- [90] T. Hypothermia and A. Study, "Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 346, no. 8, pp. 549–56, Feb. 2002.
- [91] S. E. Jacobs, M. Berg, R. Hunt, W. O. Tarnow-Mordi, T. E. Inder, and P. G. Davis, "Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy.," *Cochrane database Syst. Rev.*, vol. 1, no. 1, p. CD003311, Jan. 2013.
- [92] A. Kimura, S. Sakurada, H. Ohkuni, Y. Todome, and K. Kurata, "Moderate hypothermia delays proinflammatory cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells.," *Crit. Care Med.*, vol. 30, no. 7, pp. 1499–502, Jul. 2002.
- [93] M. Y.-T. Globus, O. Alonso, W. D. Dietrich, R. Busto, and M. D. Ginsberg, "Glutamate release and free radical production following brain injury: effects of posttraumatic hypothermia.," *J. Neurochem.*, vol. 65, no. 4, pp. 1704–11, Oct. 1995.
- [94] Z. G. Huang, D. Xue, E. Preston, H. Karbalai, and A. M. Buchan, "Biphasic opening of the blood-brain barrier following transient focal ischemia: effects of hypothermia.," *Can. J. Neurol. Sci.*, vol. 26, no. 4, pp. 298–304, Nov. 1999.
- [95] G. J. Jurkovich, R. M. Pitt, P. W. Curreri, and D. N. Granger, "Hypothermia prevents increased capillary permeability following ischemia-reperfusion injury.," *J. Surg. Res.*, vol. 44, no. 5, pp. 514–21, May 1988.
- [96] M. Sanchez-Alavez, S. Alboni, and B. Conti, "Sex- and age-specific differences in core body temperature of C57Bl/6 mice.," *Age (Dordr.)*, vol. 33, no. 1, pp. 89–99, Mar. 2011.
- [97] T. Muraki, T. Nomoto, and R. Kato, "Effects of the enkephalin analogue FK33-824 on rectal temperature and respiratory rate in male mice.," *Peptides*, vol. 9, no. 4, pp. 777–82, Jul. 1988.
- [98] J. R. Wenger and R. L. Alkana, "Temperature dependence of ethanol depression in C57BL/6 and BALB/c mice.," *Alcohol*, vol. 1, no. 4, pp. 297–303, 1985.
- [99] T. S. Of and T. J. LABORATORY, *Biology of the Laboratory Mouse*, Second Edi., vol. 29, no. 4. New York, 1966.
- [100] B. J. Crabbe JC, Gallaher EJ, "Drug study: Effects of diazepam on activity, motor coordination, and body temperature, in 15 inbred strains of mice." [Online]. Available: <http://phenome.jax.org/db/qp?rtn=views/measplot&brieflook=15514&projhint=Crabbe2>.
- [101] J. A. Glasel, "Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios.," *Biotechniques*, vol. 18, no. 1, pp. 62–3, Jan. 1995.

- [102] K. L. Manchester, "Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations.," *Biotechniques*, vol. 20, no. 6, pp. 968–70, Jun. 1996.
- [103] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich, "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.," *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, vol. 51 Pt 1, no. Roberts 1985, pp. 263–73, Jan. 1986.
- [104] H. Y. Choi, S. J. Moon, B. B. Ratliff, S. H. Ahn, A. Jung, M. Lee, S. Lee, B. J. Lim, B. S. Kim, M. D. Plotkin, S. K. Ha, and H. C. Park, "Microparticles from kidney-derived mesenchymal stem cells act as carriers of proangiogenic signals and contribute to recovery from acute kidney injury.," *PLoS One*, vol. 9, no. 2, p. e87853, Jan. 2014.
- [105] D. K. Ysebaert, K. E. De Greef, S. R. Vercauteren, M. Ghielli, G. A. Verpooten, E. J. Eyskens, and M. E. De Broe, "Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury.," *Nephrol. Dial. Transplant*, vol. 15, no. 10, pp. 1562–74, Oct. 2000.
- [106] K. Solez, L. Morel-Maroger, and J. D. Sraer, "The morphology of 'acute tubular necrosis' in man: analysis of 57 renal biopsies and a comparison with the glycerol model.," *Medicine (Baltimore)*, vol. 58, no. 5, pp. 362–76, Sep. 1979.
- [107] H. R. H. de Geus, M. G. Betjes, and J. Bakker, "Biomarkers for the prediction of acute kidney injury: a narrative review on current status and future challenges.," *Clin. Kidney J.*, vol. 5, no. 2, pp. 102–108, Apr. 2012.
- [108] T. Ichimura, J. V Bonventre, V. Bailly, H. Wei, C. A. Hession, R. L. Cate, and M. Sanicola, "Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury.," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 7, pp. 4135–42, Feb. 1998.
- [109] J. Mishra, Q. Ma, A. Prada, M. Mitsnefes, K. Zahedi, J. Yang, J. Barasch, and P. Devarajan, "Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 14, no. 10, pp. 2534–43, Oct. 2003.
- [110] Gordon CJ, *Temperature regulation in laboratory rodents*. New York: Cambridge University Press, 1993.
- [111] M. Lech, C. Römmele, R. Gröbmayer, H. Eka Susanti, O. P. Kulkarni, S. Wang, H.-J. Gröne, B. Uhl, C. Reichel, F. Krombach, C. Garlanda, A. Mantovani, and H.-J. Anders, "Endogenous and exogenous pentraxin-3 limits postischemic acute and chronic kidney injury.," *Kidney Int.*, vol. 83, no. 4, pp. 647–61, Apr. 2013.
- [112] A. J. Polichnowski, R. Lan, H. Geng, K. a Griffin, M. a Venkatachalam, and A. K. Bidani, "Severe Renal Mass Reduction Impairs Recovery and Promotes Fibrosis after AKI.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, pp. 1–12, Feb. 2014.

- [113] H. J. Kim, S. J. Park, S. Koo, H. J. Cha, J. S. Lee, B. Kwon, and H. R. Cho, "Inhibition of kidney ischemia-reperfusion injury through local infusion of a TLR2 blocker.," *J. Immunol. Methods*, vol. 407, pp. 146–50, May 2014.
- [114] A. C. Caro, F. C. Hankenson, and J. O. Marx, "Comparison of thermoregulatory devices used during anesthesia of C57BL/6 mice and correlations between body temperature and physiologic parameters.," *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, vol. 52, no. 5, pp. 577–83, Sep. 2013.
- [115] A. Linkermann, J. H. Bräsen, M. Darding, M. K. Jin, A. B. Sanz, J.-O. Heller, F. De Zen, R. Weinlich, A. Ortiz, H. Walczak, J. M. Weinberg, D. R. Green, U. Kunzendorf, and S. Krautwald, "Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 29, pp. 12024–9, Jul. 2013.
- [116] M. Haq, J. Norman, S. R. Saba, G. Ramirez, and H. Rabb, "Role of IL-1 in renal ischemic reperfusion injury.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 9, no. 4, pp. 614–9, Apr. 1998.
- [117] J.-R. Yang, F.-H. Yao, J.-G. Zhang, Z.-Y. Ji, K.-L. Li, J. Zhan, Y.-N. Tong, L.-R. Lin, and Y.-N. He, "Ischemia-reperfusion induces renal tubule pyroptosis via the CHOP-caspase-11 pathway.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 306, no. 1, pp. F75–84, Jan. 2014.
- [118] T. J. Pelkey, R. S. Frank, J. J. Stanley, T. S. Frank, G. B. Zelenock, and L. G. D'Alecy, "Minimal physiologic temperature variations during renal ischemia alter functional and morphologic outcome.," *J. Vasc. Surg.*, vol. 15, no. 4, pp. 619–25, Apr. 1992.
- [119] M. L. Kielar, R. John, M. Bennett, J. a Richardson, J. M. Shelton, L. Chen, D. R. Jeyarajah, X. J. Zhou, H. Zhou, B. Chiquett, G. T. Nagami, and C. Y. Lu, "Maladaptive role of IL-6 in ischemic acute renal failure.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 16, no. 11, pp. 3315–25, Nov. 2005.
- [120] M. S. Delbridge, B. M. Shrestha, a T. Raftery, a M. El Nahas, and J. L. Haylor, "The effect of body temperature in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury.," *Transplant. Proc.*, vol. 39, no. 10, pp. 2983–5, Dec. 2007.
- [121] R. a Zager, "Hyperthermia: effects on renal ischemic/reperfusion injury in the rat.," *Lab. Invest.*, vol. 63, no. 3, pp. 360–9, Sep. 1990.
- [122] R. a. Zager, D. J. Gmur, C. R. Bredl, and M. J. Eng, "Degree and time sequence of hypothermic protection against experimental ischemic acute renal failure.," *Circ. Res.*, vol. 65, no. 5, pp. 1263–9, Nov. 1989.
- [123] G. W. Stone, K. Vora, J. Schindler, C. Diaz, T. Mann, G. Dangas, P. Best, and D. E. Cutlip, "Systemic hypothermia to prevent radiocontrast nephropathy (from the COOL-RCN Randomized Trial).," *Am. J. Cardiol.*, vol. 108, no. 5, pp. 741–6, Sep. 2011.
- [124] A. Zeiner, G. Sunder-Plassmann, F. Sterz, M. Holzer, H. Losert, A. N. Laggner, and M. Müllner, "The effect of mild therapeutic hypothermia on renal function after

- cardiopulmonary resuscitation in men.," *Resuscitation*, vol. 60, no. 3, pp. 253–61, Mar. 2004.
- [125] M. Boodhwani, F. D. Rubens, D. Wozny, and H. J. Nathan, "Effects of mild hypothermia and rewarming on renal function after coronary artery bypass grafting.," *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 87, no. 2, pp. 489–95, Feb. 2009.
- [126] E. M. Moore, A. D. Nichol, S. a Bernard, and R. Bellomo, "Therapeutic hypothermia: benefits, mechanisms and potential clinical applications in neurological, cardiac and kidney injury.," *Injury*, vol. 42, no. 9, pp. 843–54, Sep. 2011.
- [127] N. Zealand and I. Care, "The Prophylactic Hypothermia Trial to Lessen Traumatic Brain Injury (POLAR-RCT)," *Clin. Identifier NCT00987688*, no. April 2012, 2014.
- [128] "Editorial: Local renal hypothermia.," *Br. Med. J.*, vol. 3, no. 5975, pp. 62–3, Jul. 1975.
- [129] R. Guerra, E. P. Leonardi, R. A. Otsuka, J. Quitzan, P. R. Kawano, H. A. Yamamoto, J. L. Amaro, and O. E. H. Fugita, "Cold renal ischemia: comparison of efficacy between two techniques of cooling, in a swine model.," *J. Endourol.*, vol. 24, no. 3, pp. 445–9, Mar. 2010.
- [130] R. H. Thompson, I. Frank, C. M. Lohse, I. R. Saad, A. Fergany, H. Zincke, B. C. Leibovich, M. L. Blute, and A. C. Novick, "The impact of ischemia time during open nephron sparing surgery on solitary kidneys: a multi-institutional study.," *J. Urol.*, vol. 177, no. 2, pp. 471–6, Feb. 2007.
- [131] C. D. Ames, R. Venkatesh, K. J. Weld, K. Morrissey, K. V Foyil, T. Shen, S. Dryer, G. Hruby, S. P. Sutera, and J. Landman, "Laparoscopic renal parenchymal hypothermia with novel ice-slush deployment mechanism.," *Urology*, vol. 66, no. 1, pp. 33–7, Jul. 2005.
- [132] B. Laven, M. Orvieto, M. Chuang, C. Ritch, P. Murray, R. Harland, S. Inman, C. Brendler, and a Shalhav, "Renal Tolerance To Prolonged Warm Ischemia Time in a Laparoscopic Versus Open Surgery Porcine Model," *J. Urol.*, vol. 172, no. 6, pp. 2471–2474, Dec. 2004.
- [133] R. Noor, C. X. Wang, and A. Shuaib, "Effects of hyperthermia on infarct volume in focal embolic model of cerebral ischemia in rats.," *Neurosci. Lett.*, vol. 349, no. 2, pp. 130–2, Oct. 2003.
- [134] B. Florian, R. Vintilescu, A. T. Balseanu, A.-M. Buga, O. Grisk, L. C. Walker, C. Kessler, and A. Popa-Wagner, "Long-term hypothermia reduces infarct volume in aged rats after focal ischemia.," *Neurosci. Lett.*, vol. 438, no. 2, pp. 180–5, Jun. 2008.
- [135] T. Eckle, A. Grenz, D. Köhler, A. Redel, M. Falk, B. Rolaufts, H. Osswald, F. Kehl, and H. K. Eltzschig, "Systematic evaluation of a novel model for cardiac ischemic preconditioning in mice.," *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 291, no. 5, pp. H2533–40, Nov. 2006.

- [136] P. a Barber, L. Hoyte, F. Colbourne, and A. M. Buchan, "Temperature-regulated model of focal ischemia in the mouse: a study with histopathological and behavioral outcomes.," *Stroke.*, vol. 35, no. 7, pp. 1720–5, Jul. 2004.
- [137] S. A. Bernard, T. W. Gray, M. D. Buist, B. M. Jones, W. Silvester, G. Gutteridge, and K. Smith, "Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 346, no. 8, pp. 557–63, Feb. 2002.
- [138] S. Shankaran, A. R. Laptook, R. a Ehrenkranz, J. E. Tyson, S. a McDonald, E. F. Donovan, A. a Fanaroff, W. K. Poole, L. L. Wright, R. D. Higgins, N. N. Finer, W. a Carlo, S. Duara, W. Oh, C. M. Cotten, D. K. Stevenson, B. J. Stoll, J. a Lemons, R. Guillet, and A. H. Jobe, "Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 353, no. 15, pp. 1574–84, Oct. 2005.
- [139] S. Shankaran, A. Pappas, S. A. McDonald, B. R. Vohr, S. R. Hintz, K. Yolton, K. E. Gustafson, T. M. Leach, C. Green, R. Bara, C. M. Petrie Huitema, R. A. Ehrenkranz, J. E. Tyson, A. Das, J. Hammond, M. Peralta-Carcelen, P. W. Evans, R. J. Heyne, D. E. Wilson-Costello, Y. E. Vaucher, C. R. Bauer, A. M. Dusick, I. Adams-Chapman, R. F. Goldstein, R. Guillet, L.-A. Papile, and R. D. Higgins, "Childhood outcomes after hypothermia for neonatal encephalopathy.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 366, no. 22, pp. 2085–92, May 2012.
- [140] J. Muñiz, J. Romero, M. Holubiec, G. Barreto, J. González, M. Saint-Martin, E. Blanco, J. Carlos Cavicchia, R. Castilla, and F. Capani, "Neuroprotective effects of hypothermia on synaptic actin cytoskeletal changes induced by perinatal asphyxia.," *Brain Res.*, vol. 1563, pp. 81–90, May 2014.
- [141] S. M. Bagshaw, "Short- and long-term survival after acute kidney injury.," *Nephrol. Dial. Transplant*, vol. 23, no. 7, pp. 2126–8, Jul. 2008.
- [142] T. S. Olsen, H. S. Olsen, and H. E. Hansen, "Arckh , A Tubular ultrastructure in acute renal failure in man : epithelial necrosis and regeneration," pp. 75–89, 1985.

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ADH	Antidiuretisches Hormon
ADQI	<i>Acute Dialysis Quality Initiative</i>
AKI	Akute Nierenschädigung (Acute Kidney Injury)
AKIN	Acute Kidney Injury Network (AKI Netzwerk)
ANV	Akutes Nierenversagen
ATN	Akute Tubulusnekrose
ATP	Adenosintriphosphat
cDNA	Komplementäre DNA
CP	Crossing Point
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAMP	<i>damage-associated molecular patterns</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ESKD	Terminales Nierenversagen (<i>end stage kidney disease</i>)
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GST	Glutathione S – Transferase
ISOM	Innerer Streifen der äußeren Medulla (<i>Inner Stripe of outer medulla</i>)
Iv	intravenös
IR	Ischämie Reperfusion
KDIGO	<i>Kidney Disease/Improving Global Outcomes</i> Arbeitsgruppe
KIM-1	Kidney Injury Molecule 1
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchloridlösung
NGAL	Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin
NSAID	Nicht steroidale antiinflammatorische Drogen
OP	Operation
OSOM	Äußerer Streifen der äußeren Medulla (<i>Outer Stripe of outer medulla</i>)
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PAS	Perjodsäure Schiff
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
qPCR	quantitative PCR
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
rcf	relative centrifugal force
RIFLE	Risk Injury Failure Loss End Stage Renal Disease
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Oxidationsprodukte
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
rtPCR	real time PCR
SD	Standartabweichung

SEM	Standard error of the mean
TINU	Tubulointerstitielle Nephritis- und Uveitis-Syndrom
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Lebenslauf

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Anders für die Überlassung des interessanten Themas, für die ausdauernde und motivierende Unterstützung und Förderung auch über die Promotion hinaus.

Herrn Julian Marschner gebührt mein größter Dank für die stete fachliche und menschliche Betreuung. Er hat wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen, indem er mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Weiterhin möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danken, die mich sehr herzlich aufgenommen haben und mir beim Erlernen der Methodik auch abends und am Wochenende mit viel Geduld und Zeit und vor allem Expertise zur Seite gestanden haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die immer und in allen Lebenslagen für mich da sind, die mir mein Medizinstudium ermöglicht haben und nie an mir gezweifelt haben.

Anhang

A

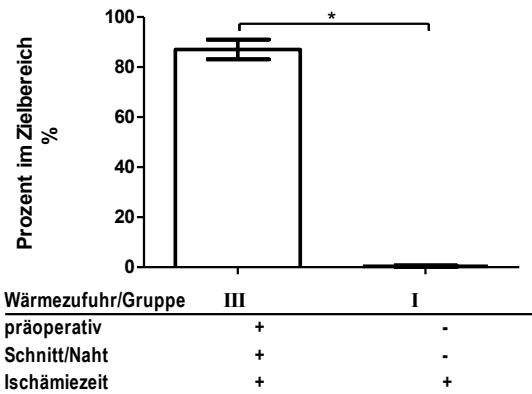
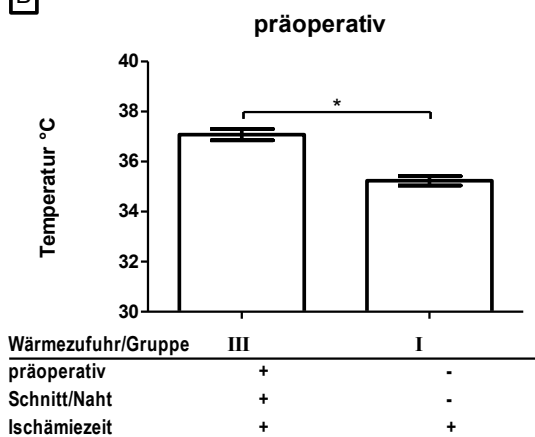


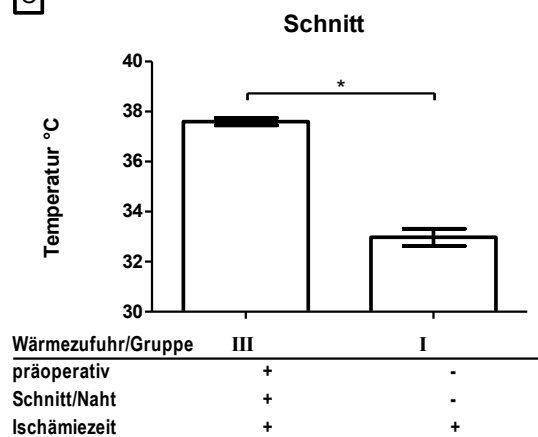
Abbildung 34: Vergleich der Temperaturkontrolle von neu etabliertem Versuchsaufbau (Wärmezufuhr in allen Phasen) und bisher benutztem Versuchsaufbau (Wärmezufuhr während der Ischämiezeit). n=5, weibliche Mäuse *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. durch Balken angezeigte Gruppe.

A: prozentualer Anteil der gemessenen Werte im Zielbereich zwischen 36.5°C und 38.5°C. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. B – E: Mittlere Temperatur über die verschiedenen Phasen präoperativ, Schnitt, Ischämiezeit und Naht. Auch hier zeigt sich ein signifikanter Unterschied der mittleren Körpertemperatur zwischen den verschiedenen Versuchsaufbauten.

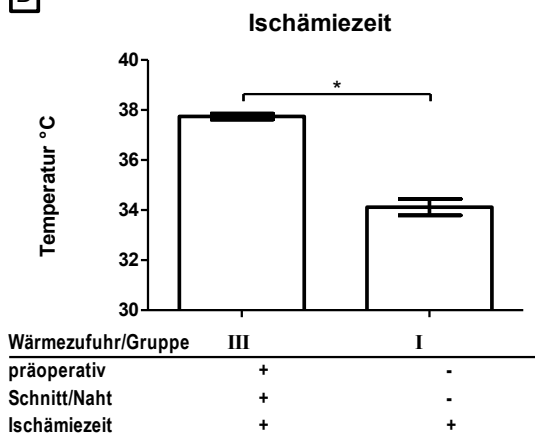
B



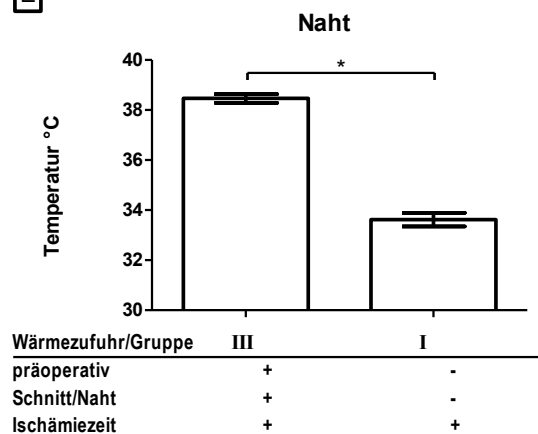
C



D



E



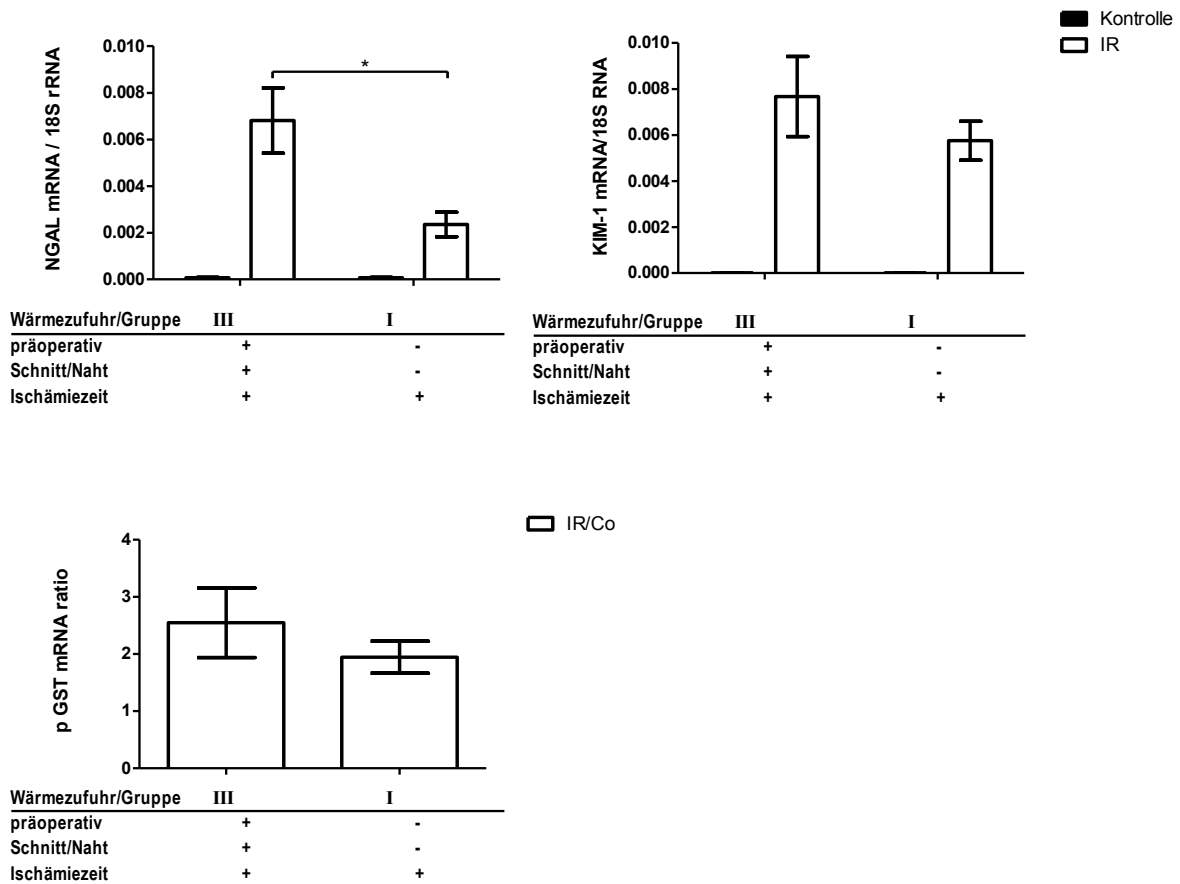


Abbildung 35: Expression Tubulärer Schädigungsmarker. Dargestellt in der Abszisse sind die verschiedenen Versuchsaufbauten mit Wärmezufuhr in allen Phasen der IR (Gruppe III) oder lediglich in der Ischämiezeit (Gruppe I). Der Effekt der Maustemperatur auf die tubuläre Schädigung wurde durch die Expression verschiedener tubulärer Schädigungsmarker (KIM-1, p-GST und NGAL) analysiert. Für NGAL zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe I und Gruppe III, p-GST und KIM-1 zeigen lediglich eine Tendenz. P-GST wurde berechnet indem der mRNA/ 18S rRNA Quotient der ischämischen Niere dividiert wurde durch selbigen Quotienten der kontralateralen Niere, um technisch bedingte Schwankungen des kontralateralen Quotienten zu eliminieren. N=5, weibliche Mäuse. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Gruppe I.

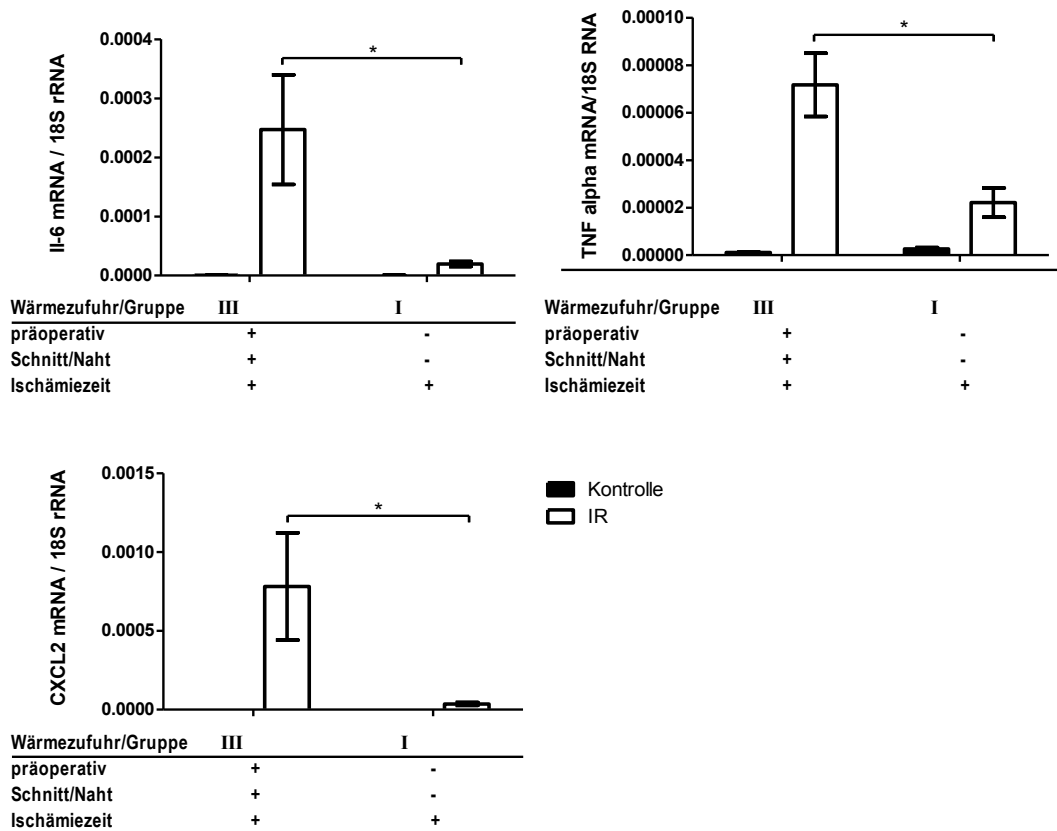


Abbildung 36: Expression proinflammatorischer Faktoren. Dargestellt in der Abszisse sind die verschiedenen Versuchsaufbauten mit Wärmezufuhr in allen Phasen der IR (Gruppe III) oder lediglich in der Ischämiezeit (Gruppe I). Der Effekt der Maustemperatur auf die Inflammation wurde durch die Expression verschiedener inflammatorischer Marker (CXCL-2, IL-6 und TNF- α) analysiert. Für alle drei zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe I und Gruppe III. N=5, weibliche Mäuse. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. durch Balken angezeigte Gruppe.

Eidesstattliche Versicherung

Schäfer, Hannah

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Einfluss der Körperkerntemperatur auf den Ischämie-Reperfusionsschaden der Niere

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin